

# **Contribución de los factores GATA a la organogénesis pancreática y a la función del páncreas adulto**

Memoria presentada por D. Manuel Carrasco Fernández para optar al  
grado de Doctor

Sevilla, 5 de febrero de 2016

La Directora de la Tesis,

El Codirector de la Tesis,

El doctorando,

Dra. Anabel Rojas González

Dr. Francisco Martín Bermudo

D. Manuel Carrasco Fernández

# ÍNDICE



ÍNDICE	2
ABREVIATURAS	7
I.INTRODUCCIÓN	10
1. EL PÁNCREAS DE MAMÍFEROS	11
1.1. FUNCIÓN Y ANATOMÍA DEL PÁNCREAS	11
1.2. FISIOLÓGIA DE LA CÉLULA $\beta$ PANCREÁTICA	13
1.3. ENFERMEDADES ASOCIADAS A LA DISFUNCIÓN DEL PÁNCREAS	15
1.3.1. PANCREATITIS	16
1.3.2. CÁNCER DE PÁNCREAS	17
1.3.3. FIBROSIS QUÍSTICA	17
1.3.4. DIABETES MELLITUS	18
2. ORGANOGÉNESIS PANCREÁTICA	21
3. ETAPAS DEL DESARROLLO EMBRIONARIO DEL PÁNCREAS	21
3.1.1. ESPECIFICACIÓN PANCREÁTICA (E8.5-12.5).	22
3.1.2. TRANSICIÓN SECUNDARIA (E12.5-15.5)	25
3.1.3. DIFERENCIACIÓN Y MADURACIÓN (E18.5-POSTNATAL)	28
4. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN IMPLICADOS EN LA ORGANOGÉNESIS PANCREÁTICA.	29
5. DIFERENCIAS ENTRE EL DESARROLLO EMBRIONARIO PANCREÁTICO EN HUMANOS Y RATONES	38
6. LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN GATA	40
II. MATERIALES Y MÉTODOS	49
1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	49
1.1. ANIMALARIO Y PROTOCOLOS DE MANIPULACIÓN DE ANIMALES	49
1.2. LÍNEAS DE RATONES CON GENES REPORTEROS	49
1.2.1. LÍNEA DE RATÓN ROSA26R-LACZ	49
1.2.2. LÍNEA DE RATÓN PDX1-LACZ	50
1.3. LÍNEAS DE RATONES FLOXEADOS	51
1.3.1. GATA4 FLOX/FLOX	51
1.3.2. GATA6FLOX/FLOX	51
1.4. LÍNEAS DE RATONES TRANSGÉNICOS CON LA RECOMBINASA CRE: PDX1-CRE	51
1.5. GENERACIÓN DE RATONES GATA4 Y GATA6 KNOCKOUT CONDICIONALES.	52
2 LÍNEAS CELULARES	53
2.1. MPAC	53
3 MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	53
3.1. EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO PARA EL GENOTIPADO DE RATONES	53
3.2. TÉCNICAS DE GENOTIPADO DE RATÓN	54
3.2.1. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	54
3.2.2. SOUTHERN BLOT	57
3.3. EXTRACCIÓN DE ADN PLASMÍDICO	58
3.4. EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL	59
4 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO, CLONAJE Y MUTAGÉNESIS	61
4.1. BLAST Y VISTA	61

4.2.	CLONAJE Y MUTAGÉNESIS	61
4.2.1.	PDX1-WT-LACZ	61
4.2.2.	PDX1-MUT-LACZ	62
5	OBTENCIÓN, PROCESAMIENTO Y MONTAJE DE TEJIDOS	62
5.1.	OBTENCIÓN DE TEJIDOS EMBRIONARIOS A DISTINTOS ESTADIOS DE GESTACIÓN	62
5.2.	OBTENCIÓN DE TEJIDO PANCREÁTICO DE RATONES ADULTOS	63
5.3.	FIJACIÓN, CAPTURA DE IMÁGENES, PROCESAMIENTO Y MONTAJE DE TEJIDOS	63
5.4.	CORTE DE TEJIDOS EN MICROTOMO	64
6	HISTOLOGÍA	65
6.1.	TINCIÓN CON X-GAL	65
6.2.	TINCIÓN CON HEMATOXILINA Y EOSINA (H&E)	66
6.3.	TINCIÓN TRICRÓMICA DE GOMORI	67
7	TÉCNICAS DE INMUNOHISTOQUÍMICA/INMUNOFLUORESCENCIA	67
7.1.	INMUNOHISTOQUÍMICA/INMUNOFLUORESCENCIA	67
7.2.	LISTA DE ANTICUERPOS:	69
8	CUANTIFICACIONES	70
8.1.	CUANTIFICACIÓN DEL ÁREA ACINAR	70
8.2.	CUANTIFICACIÓN DEL ÁREA DE CÉLULAS $\beta$ PANCREÁTICAS	70
8.3.	CUANTIFICACIÓN DE CÉLULAS PROLIFERATIVAS	70
8.4.	CUANTIFICACIÓN DE CÉLULAS APOPTÓTICAS	71
9	CUANTIFICACIÓN DE TRANSCRITOS DE ARNs MENSAJERO POR PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL	71
9.1.	REACCIÓN DE LA TRANSCRIPTASA REVERSA	71
9.2.	REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA A TIEMPO REAL	72
10	ELECTROMOBILITY SHIFT ASSAY (EMSA)	72
11	ESTUDIOS IN VIVO	75
11.1.	TEST DE TOLERANCIA INTRAPERITONEAL A LA GLUCOSA (IGTT)	75
11.2.	ANÁLISIS DE SECRECIÓN DE INSULINA EN PLASMA	75
11.3.	TEST DE TOLERANCIA INTRAPERITONEAL A LA INSULINA (IITT)	76
11.4.	MODELO DE DIABETES INDUCIDA POR ADMINISTRACIÓN DE BAJA CONCENTRACIÓN DE ESTREPTOZOTOCINA EN MÚLTIPLES DOSIS	76
11.5.	MODELO DE PANCREATITIS AGUDA INDUCIDA POR CERULEÍNA	77
11.6.	ACTIVIDAD AMILASA EN SUERO	77
12	CHROMATIN IMMUNOPRECIPITATION (CHIP)	78
13	MICROARRAY	79
14	TRANSFECCIONES TRANSITORIAS	79
15	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	80
16	COMITÉ ÉTICO	80
III.	RESULTADOS	83
1	CONTRIBUCIÓN DE LOS FACTORES GATA A LA ORGANOGÉNESIS PANCREÁTICA.	83
1.1.	PATRÓN DE EXPRESIÓN DE LOS FACTORES GATA DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO PANCREÁTICO	83
1.2.	GENERACIÓN DE MUTANTES CONDICIONALES PARA GATA4 EN EL ENDODERMO PANCREÁTICO.	85
1.3.	GENERACIÓN DE MUTANTES CONDICIONALES PARA GATA6 EN EL ENDODERMO PANCREÁTICO.	90
1.4.	LA INACTIVACIÓN CONJUNTA DE GATA4 Y GATA6 CAUSA AGENESIA PANCREÁTICA.	93
1.5.	MOSAISCISMO EN LA ESCISIÓN DE LOS SITIOS LoxP POR LA RECOMBINASA CRE	97
1.6.	DIFERENCIAS FENOTÍPICAS SEGÚN LA DOSIS ALÉLICA DE GATA4 Y GATA6.	99

2	BLOQUEOS EN LA EXPANSIÓN DEL EPITELIO PANCREÁTICO EN AUSENCIA DE GATA4 Y GATA6.	101
2.1.	DEFECTOS EN LA FORMACIÓN Y DESARROLLO DEL EPITELIO PANCREÁTICO EN RATONES DKO	101
2.2.	LOS RATONES DKO PRESENTAN DEFECTOS EN LA PROLIFERACIÓN DE LAS MPCs.	104
2.3.	LA TASA DE APOPTOSIS CELULAR NO SE VE AFECTADA EN RATONES DKO.	106
2.4.	LAS CÉLULAS DEL ENDODERMO PANCREÁTICO PRESENTAN DEFECTOS EN LA DIFERENCIACIÓN EN AUSENCIA DE GATA4 Y GATA6	107
2.5.	LA AUSENCIA DE GATA4 Y GATA6 EN RATONES AFECTA AL MANTENIMIENTO DEL POOL DE PROGENITORES PANCREÁTICOS	109
2.6.	LA AUSENCIA DE GATA4 Y GATA6 RECAPITULA LA AGENESIA PANCREÁTICA QUE OCURRE TRAS LA INACTIVACIÓN DE OTROS GENES CLAVES EN LA ORGANOGÉNESIS PANCREÁTICA.	112
3	LOS FACTORES GATA4 Y GATA6 SON ACTIVADORES DIRECTOS DEL GEN PDX1	114
3.1.	REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL GEN PDX1	114
3.2.	LAS SECUENCIAS REGULADORAS DEL ÁREA III DEL GEN PDX1 CONTIENE DOS SITIOS GATA ALTAMENTE CONSERVADOS EN MAMÍFEROS.	115
3.3.	LAS PROTEÍNAS GATA4 Y GATA6 SON CAPACES DE UNIRSE EN ENSAYOS DE UNIÓN IN VITRO A LOS SITIOS PDX1 G1 Y G2	116
3.4.	EXISTEN SITIOS GATA CONSERVADOS EN ÁREA I DEL PROMOTOR DE PDX1.	119
3.5.	ENSAYOS DE INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA (CHIP) EN LÍNEAS CELULARES MUESTRAN LA UNIÓN DIRECTA DE GATA4 Y GATA6 A LOS SITIOS GATA DEL ÁREA III DEL GEN PDX1.	120
3.6.	GATA4 Y GATA6 SON REGULADORES TRANSCRIPCIONALES DIRECTOS DE LA EXPRESIÓN DE PDX1 EN LÍNEAS CELULARES	123
3.7.	LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DE PDX1 IN VIVO DEPENDE DE FACTORES GATA	124
4	LOS PROGENITORES MULTIPOTENTES PANCREÁTICOS ADQUIEREN UN FENOTIPO HEPÁTICO EN AUSENCIA DE GATA4 Y GATA6	129
4.1.	LA INACTIVACIÓN DE GATA4 Y GATA6 EN EL EPITELIO PANCREÁTICO PROVOCA LA PÉRDIDA DE IDENTIDAD PANCREÁTICA Y LA ADQUISICIÓN DE UN FENOTIPO HEPÁTICO.	129
4.2.	LOS RATONES GATA4/GATA6 DKO FENOCOPIAN LA CONVERSIÓN DE LINAJE PANCREÁTICO A LINAJE HEPÁTICO OBSERVADO EN LOS RATONES KNOCKOUT PARA SOX9	131
5	PAPEL DE LOS FACTORES GATA EN EL PÁNCREAS DE RATONES ADULTOS	134
5.1.	PATRÓN DE EXPRESIÓN DE LOS FACTORES GATA EN ESTADIOS ADULTOS EN EL PÁNCREAS	134
5.2.	PAPEL DE GATA6 EN EL PÁNCREAS EXOCRINO ADULTO	135
5.2.1.	GATA6 ES NECESARIO PARA LA REGENERACIÓN DEL TEJIDO ACINAR TRAS LA INDUCCIÓN DE PANCREATITIS MEDIADA POR TRATAMIENTO CON CERULEÍNA	135
5.2.2.	LOS RATONES DEFICIENTES EN GATA6 SON MÁS SUSCEPTIBLES AL DAÑO POR CERULEÍNA Y AFECTA A LA CORRECTA REGENERACIÓN DEL PÁNCREAS EXOCRINO.	140
5.2.3.	EL DEFECTO DE LA REGENERACIÓN DE LOS PÁNCREAS GATA6 KNOCKOUT NO SE DEBE A FALLOS EN LA PROLIFERACIÓN NI EN LA MUERTE CELULAR.	142
5.3.	PAPEL DE GATA6 EN LA FUNCIÓN ENDOCRINA DEL PÁNCREAS	143
5.3.1.	LOS RATONES JÓVENES GATA6 KO MANTIENEN UNA HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA NORMAL.	143
5.3.2.	LOS RATONES DEFICIENTES GATA6 DESARROLLAN INTOLERANCIA A LA GLUCOSA A PARTIR DE LOS 5 MESES DE EDAD	144
	IV. DISCUSIÓN	150
	V. CONCLUSIONES	160
	VI. BIBLIOGRAFÍA	164
	VII. ANEXOS	178

# ABREVIATURAS

<b>4HET/6KO</b>	<i>Gata4</i> heterocigoto, <i>Gata6</i> knockout ( <i>Gata4</i> <sup>flox/+</sup> ; <i>Gata6</i> <sup>flox/flox</sup> ; <i>Pdx1-Cre</i> )
<b>4KO/6HET</b>	<i>Gata4</i> knockout, <i>Gata6</i> heterocigoto ( <i>Gata4</i> <sup>flox/flox</sup> ; <i>Gata6</i> <sup>flox/+</sup> ; <i>Pdx1-Cre</i> )
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	Ácido desoxirribonucleico complementario
<b>Ami</b>	Amilasa
<b>APS</b>	<i>Amonium persulfate</i> (Persulfato de amonio)
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>Arx</b>	<i>Aristaless related homeobox</i>
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>bHLH</b>	<i>Basic helix-loop-helix</i>
<b>BMP</b>	<i>Bone morphogenic protein</i> (Proteína morfogénica ósea)
<b>BSA</b>	<i>Bovin Serum Albumin</i> (Albúmina de suero bovino)
<b>Cre</b>	Cyclation recombination (Ciclación por recombinación)
<b>DAPI</b>	4',6-diamino-2-fenilindol
<b>DKO</b>	Doble knockout ( <i>Gata4</i> <sup>flox/flox</sup> ; <i>Gata6</i> <sup>flox/flox</sup> ; <i>Pdx1-Cre</i> )
<b>DM</b>	<i>Diabetes mellitus</i>
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido
<b>DNasa</b>	Deoxirribonucleasa
<b>dNTP</b>	Desoxinucleótidos trifosfato
<b>e</b>	estadio embrionario
<b>EDTA</b>	Ácido Etilendiaminotetraacético
<b>FGF</b>	<i>Fibroblast Growth Factor</i> (Factor de crecimiento fibroblástico)
<b>Gata4 KO</b>	<i>Gata4</i> knockout ( <i>Gata4</i> <sup>flox/flox</sup> ; <i>Pdx1-Cre</i> )
<b>Gata6 KO</b>	<i>Gata6</i> knockout ( <i>Gata6</i> <sup>flox/flox</sup> ; <i>Pdx1-Cre</i> )
<b>Gck</b>	Glucokinasa
<b>Gluc</b>	Glucagón
<b>H&amp;E</b>	Hematoxilina y eosina
<b>Hes1</b>	<i>Hairy and enhancer of split 1</i>
<b>Hh</b>	<i>Hedgehog</i>
<b>HNF1a</b>	<i>Hepatocyte nuclear factor 1a</i>
<b>HNF4a</b>	<i>Hepatocyte nuclear factor 4a</i>
<b>HNF4b</b>	<i>Hepatocyte nuclear factor 4b</i>
<b>HRP</b>	<i>Horseradish peroxidase</i> (Peroxidasa de rábano)
<b>IF</b>	Inmunofluorescencia
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina de tipo G
<b>IGTT</b>	<i>Intraperitoneal glucose tolerance test</i> (test de tolerancia a la glucosa intraperitoneal)
<b>IHC</b>	<i>Immunohistochemistry</i> (Inmunohistoquímica)
<b>Ins</b>	Insulina
<b>Kb</b>	Kilobases
<b>KO</b>	<i>Knockout</i> (gen anulado)
<b>LB</b>	medio Luria-Bertani
<b>Math6</b>	<i>Mouse athonal homolog 6</i>
<b>min</b>	minuto
<b>MODY</b>	<i>Maturity-onset diabetes of the young</i> (diabetes que aparece en jóvenes con el patrón de diabetes en adultos)

<b>mPAC</b>	<i>Murine Pancreatic AdenoCarcinoma</i>
<b>MPCs</b>	<i>Multipotent Progenitor Cells</i> (Células progenitoras multipotentes)
<b>mut</b>	mutante
<b>NaCl</b>	Cloruro de sodio
<b>NaOH</b>	Hidróxido de sodio
<b>Neurod1</b>	<i>Neurogenic differentiation factor 1</i>
<b>Neurog3</b>	<i>Neurogenin3</i>
<b>Nkx2.2</b>	<i>NK2 transcription factor related, locus 2</i>
<b>Nkx6.1</b>	<i>NK6 homeobox 1</i>
<b>P/E</b>	<i>Penicillin/Streptomycin</i> (Penicilina/Estreptomicina)
<b>Pax4</b>	<i>paired box gene 4</i>
<b>Pb</b>	Pares de bases
<b>PBS</b>	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Solución salina con fosfato)
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (reacción en cadena de la polimerasa)
<b>pd</b>	Páncreas dorsal
<b>Pdx1</b>	<i>Pancreatic and duodenal homeobox 1</i>
<b>PFA</b>	Paraformaldehído
<b>PHH3</b>	Fosfohistona H3
<b>PP</b>	Polipéptido pancreático
<b>Ptf1a</b>	<i>Pancreas-specific transcription factor 1</i>
<b>pv</b>	Páncreas ventral
<b>RT-qPCR</b>	<i>Real Time - quantitative Polymerase Chain Reaction</i> (PCR cuantitativa en tiempo real)
<b>SDS</b>	<i>Sodium Dodecil Sulfate</i> (Dodecil sulfato sódico)
<b>Shh</b>	Sonic Hedgehog
<b>SMA</b>	<i>Smooth muscle <math>\alpha</math>-actin</i> (Actina del músculo liso)
<b>Sox9</b>	<i>SRY-box containing gene 9</i>
<b>TAE</b>	Tris, acético, EDTA
<b>TEMED</b>	N, N, N', N'- tetrametiletilendiamida
<b>Tgf-<math>\beta</math></b>	<i>Transforming Growth Factor beta</i> (Factor de <i>wild type</i> (silvestre))
<b>wt</b>	<i>wild type</i> (silvestre)
<b><math>\beta</math>-gal</b>	$\beta$ -galactosidasa



# I.INTRODUCCIÓN



## **1. EL PÁNCREAS DE MAMÍFEROS**

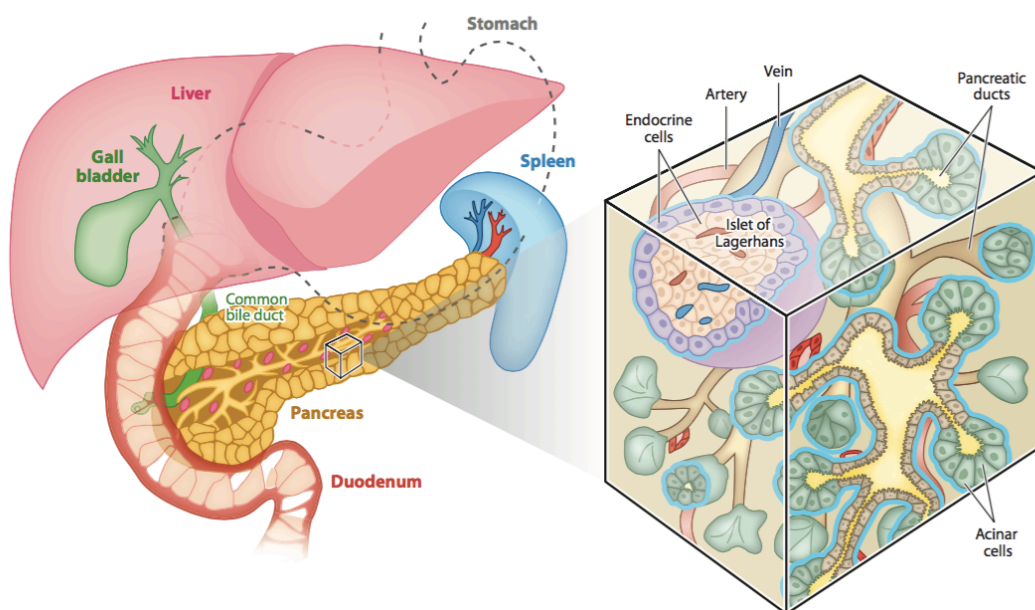
### **1.1. FUNCIÓN Y ANATOMÍA DEL PÁNCREAS**

El páncreas de los mamíferos es un órgano glandular formado por un epitelio exocrino y otro endocrino. El epitelio exocrino participa en la digestión de nutrientes y el epitelio endocrino juega un papel fundamental en la homeostasis de la glucosa. El páncreas está localizado en el abdomen, junto al estómago, y se encuentra rodeado por otros órganos como el hígado, el intestino delgado, el bazo y los riñones.

El páncreas exocrino comprende aproximadamente el 90% de la masa de la glándula pancreática (Ondine Cleaver, 2010) y está formado por acinos que producen y secretan las enzimas digestivas, que alcanzan el duodeno a través de una red de ductos. Entre las enzimas producidas por las células acinares destacan proteasas como quimotripsinógeno, tripsinógeno, procarboxipeptidasas y proelastasas, que son secretadas como proenzimas para evitar la autodigestión del tejido. Además, también se producen y secretan otras enzimas como lipasas,  $\alpha$ -amilasa pancreática, ARNasas y ADNasas que intervienen en la digestión de los alimentos. Otro tipo celular que interviene en el proceso de la digestión, las células centroacinares, es el responsable de la producción del jugo pancreático, rico en bicarbonato y mucinas. Todas estas secreciones son vertidas a la red de ductos que finalmente confluyen en el ducto pancreático principal. El conducto pancreático principal conecta con el conducto biliar común, procedente del hígado, a través de la ampolla hepatopancreática o ampolla de Vater. Aquí confluyen tanto el jugo pancreático como la bilis y ambos se vierten al duodeno para contribuir a la digestión de los alimentos (Slack, 1995).

La porción endocrina comprende al menos cinco tipos distintos de células productoras de hormonas, organizadas en unas estructuras denominadas islotes de Langerhans. Dentro de estas células se incluyen las células  $\alpha$ , productoras de glucagón; células  $\beta$ , que secretan insulina; células  $\delta$ , que sintetizan somatostatina;

células PP, que producen polipéptido pancreático; y células  $\epsilon$ , secretoras de grelina. Los islotes pancreáticos juegan un papel decisivo en el control de la homeostasis de la glucosa mediante la regulación de la concentración de glucosa circulante en el torrente sanguíneo a través de la acción de estas hormonas. Este compartimento representa alrededor el 2% de la masa total del páncreas (Githens, 1988)



**Figura 1. Representación esquemática de la anatomía del páncreas.** Adaptado de (Shih et al., 2013)

Existen numerosos estudios que explican las diferencias existentes entre el páncreas humano y murino. Las diferencias anatómicas y funcionales entre ratones y humanos (debidas probablemente a los patrones de expresión de ciertos genes) reflejan las diferencias fisiológicas y evolutivas para acomodar las necesidades de insulina tanto en condiciones normales como en situaciones patológicas (Kim et al., 2009). En lo referente a la distribución de células en los islotes de Langerhans, en roedores las células  $\beta$  contribuyen en torno al 60-70% de la masa total del islote, mientras que las células  $\alpha$  productoras de glucagón aparecen en un 15-20% y las células  $\delta$  en un 5-10%. Las células menos representadas, en torno a un 5% del total, son las células  $\epsilon$  y las PP (Cabrera et al., 2006; Steiner et al., 2010). En humanos, el porcentaje de células endocrinas es aproximadamente un 50% de células  $\beta$ , 40% de células  $\alpha$ , 10% de células  $\delta$  y <1% células PP y  $\epsilon$  (Cabrera et al., 2006).

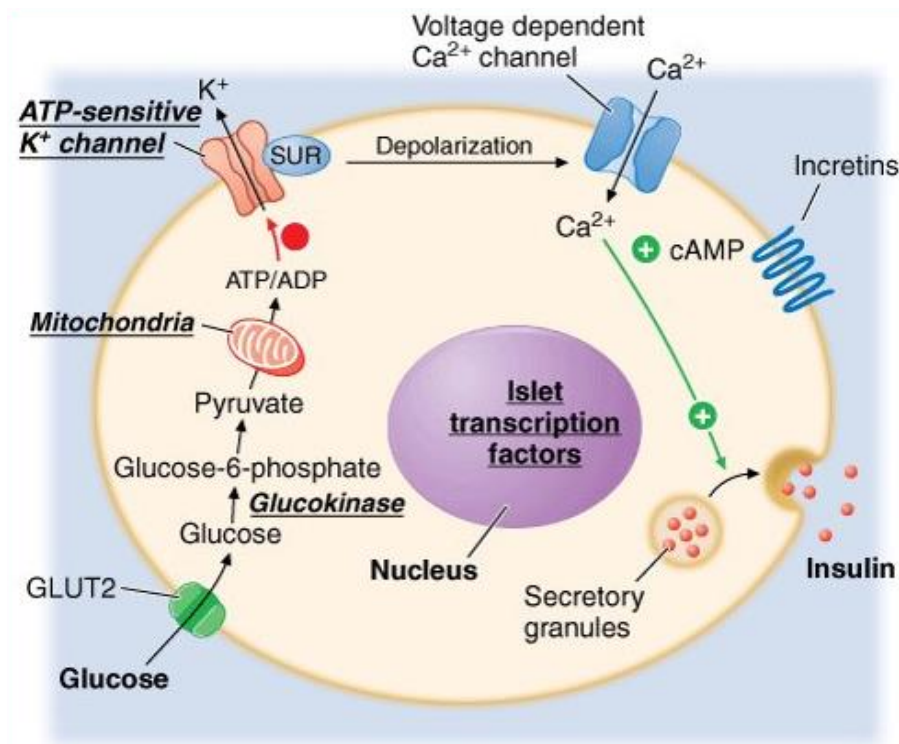
También hay diferencias reseñables entre especies en lo relativo a la organización dentro del islote. El islote típico en ratones está formado por un núcleo central de células  $\beta$  rodeado por las demás células endocrinas en la periferia. Sin embargo, en humanos las células  $\alpha$ ,  $\delta$ , PP y  $\epsilon$  aparecen distribuidas al azar dentro de la masa de células  $\beta$ .

### **1.2. FISIOLÓGÍA DE LA CÉLULA $\beta$ PANCREÁTICA: METABOLISMO DE LA GLUCOSA Y SECRECIÓN DE INSULINA**

La función principal de las células endocrinas es controlar la glucemia en un estrecho margen fisiológico. Las responsables de dicha función son las células  $\beta$ , población mayoritaria dentro del islote. Su función es sintetizar, almacenar y secretar insulina en respuesta a los niveles de glucemia. Para ello, la célula secreta insulina en respuesta a la concentración de glucosa extracelular e intracelular, valiéndose del mecanismo de acoplamiento estímulo-secreción.

El acoplamiento estímulo-secreción de la célula  $\beta$  se inicia cuando la glucosa entra en el citoplasma mediante difusión facilitada gracias a un transportador específico de glucosa (GLUT-2 en roedores, GLUT-1 en humanos). A continuación, la glucosa es modificada hasta Glucosa-6-fosfato (G6P) gracias a una hexoquinasa específica denominada Glucoquinasa (GCK), proceso que determina principalmente el flujo metabólico de la glucólisis. El resultado de esta vía metabólica es el piruvato. El piruvato es metabolizado por vía aerobia en la mitocondria a través del ciclo de Krebs, para dar lugar a  $\text{CO}_2$ , NADH y  $\text{FADH}_2$ . Gracias a estos intermediarios, en la cadena transportadora de electrones se sintetiza ATP a través de la fosforilación oxidativa. El consecuente incremento de la ratio ATP/ADP da lugar al cierre de los canales de  $\text{K}^+$  dependientes de ATP ( $\text{K}^{\text{ATP}}$ ), que provoca una despolarización de la membrana de la célula  $\beta$ . Esta despolarización induce la apertura de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje, permitiendo así la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ . El incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico derivado de la apertura de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes del potencial de membrana desencadena la secreción de insulina por exocitosis de los gránulos de

insulina que se fusionan a la membrana celular (Fig. 2) .(Newsholme et al., 2010; Quesada et al., 2008)



**Figura 2. Representación esquemática del mecanismo de secreción de insulina en la célula  $\beta$  pancreática.** Adaptado de *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 17th Edition.

La secreción de insulina ocurre siguiendo una cinética bifásica, dependiente del flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Henquin, 2009). En la primera fase, los canales  $\text{K}^{\text{ATP}}$  se abren rápidamente, permitiendo una secreción rápida de los gránulos de insulina que se acumulaban en la célula  $\beta$ , para así contrarrestar los altos niveles de glucosa en sangre. En la segunda fase, se produce una secreción sostenida y más lenta de nuevos gránulos de insulina que deben ser transportados hasta la membrana (Straub and Sharp, 2002).

La insulina ejerce su acción mediante la unión a un receptor específico presente en la membrana de los tejidos diana. El receptor de insulina está formado por dos subunidades extracelulares  $\alpha$  y dos subunidades  $\beta$  transmembrana. La insulina se une a las subunidades  $\alpha$  extracelulares, lo que provoca la fosforilación de la subunidad  $\beta$  transmembrana del receptor de insulina. A través del fosfatidilinositol-

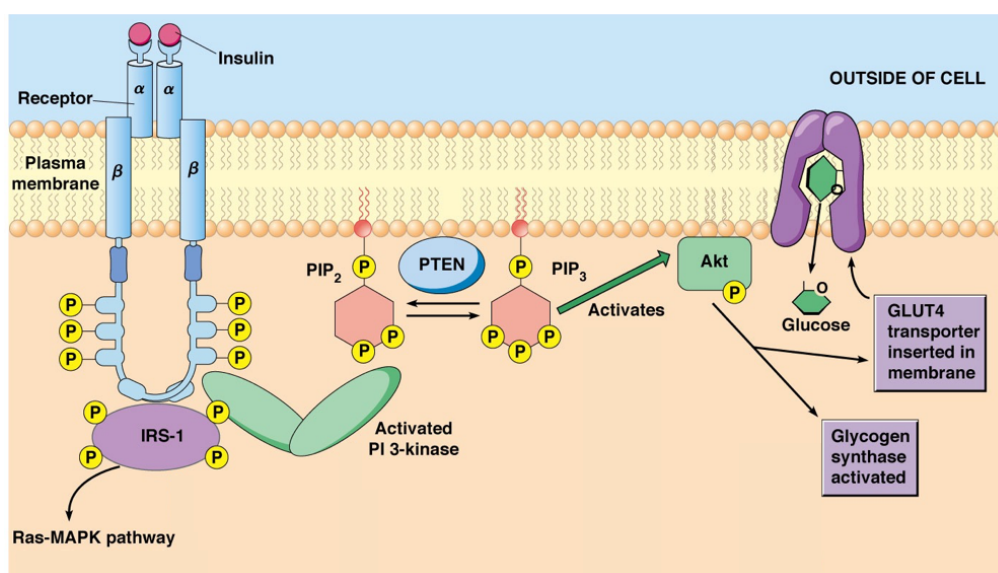
trifosfato (PIP<sub>3</sub>) y proteínas Akt, se activan otras proteínas kinasas. Esto tiene como consecuencia:

En células del músculo esquelético, tejido adiposo y otros tejidos, se promoverá un aumento de la captación de glucosa mediante el incremento del número de transportadores de glucosa GLUT-4 en la membrana plasmática de estas células.

En el hígado se producirá un incremento de los mecanismos de almacenamiento de glucosa en forma de glucógeno hepático y la síntesis de ácidos grasos libres.

En el tejido adiposo se inhibirá la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos.

En el cerebro habrá un aumento considerable del metabolismo de la glucosa así como de su absorción mediante la estimulación de los transportadores GLUT-1.



**Figura 3. Representación esquemática de la ruta de acción de la insulina a través de su receptor en los tejidos periféricos.** Adaptado de Pearson Education Inc., 2012.

### 1.3. ENFERMEDADES ASOCIADAS A LA DISFUNCIÓN DEL PÁNCREAS

Existen varias las patologías asociadas a esta glándula, entre las que destacan la pancreatitis aguda o crónica, el cáncer de páncreas, la fibrosis quística y la diabetes mellitus.

### **1.3.1. PANCREATITIS**

La pancreatitis es una enfermedad multifactorial caracterizada por la inflamación del páncreas. Esta inflamación se debe a la activación temprana de enzimas pancreáticas (principalmente enzimas proteolíticas, como la tripsina) que actúan sobre el propio tejido pancreático, dañando asimismo los tejidos y órganos adyacentes. Este evento, que comienza con la lesión pancreática, desata posteriormente una respuesta inflamatoria aguda que comprende un número elevado de complicaciones y que, generalmente, se resuelve con el tiempo (Frossard et al., 2001). En caso de que la enfermedad se cronifique, existe el riesgo de la aparición de un cáncer pancreático. Las principales causas de pancreatitis aguda son cálculos pancreáticos, consumo de alcohol, hipertrigliceridemia, colangiopancreatografía retrógrada endoscópica (ERCP), traumatismos abdominales, complicaciones post-operatorias, administración de drogas y disfunciones del esfínter de Oddi. (Jha et al., 2009)

Diversos estudios han concluido que el estrés oxidativo es en última instancia el responsable de la pancreatitis aguda. La acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) se ha relacionado con la aparición de apoptosis en células acinares (Schoenberg et al., 1990). Entre los modelos más ampliamente usados para el estudio de la pancreatitis en ratones, el uso de dosis suprafisiológicas de ceruleína es uno de los más ampliamente usados. Este modelo produce resultados morfohistológicos compatibles con la pancreatitis en humanos, incluida la fibrosis, inflamación crónica, atrofia, transdiferenciación de acinos a células ductales (metaplasias acino-ductales) y dilatación ductal (Neuschwander-Tetri et al., 2000). La ceruleína es un análogo de la colecistoquinina (CCK) y administrada a altas dosis provoca una pancreatitis aguda en ratones, caracterizada por una desregulación de la producción y secreción de enzimas digestivas. En concreto, causa la inhibición de la secreción pancreática de estas enzimas y en consecuencia, éstas se acumulan y vacuolizan, provocando la muerte de las células acinares, la formación de edema y la infiltración de células inflamatorias en el páncreas (Lerch and Adler, 1994; Willemer et al., 1992). Es por tanto que existe una relación clara entre estrés oxidativo, inflamación y apoptosis de células acinares estimulada por la administración de dosis elevadas de ceruleína (Kim, 2008).

### **1.3.2. CÁNCER DE PÁNCREAS**

El cáncer de páncreas es un tumor que se origina en la glándula pancreática. Se trata de una de las neoplasias más agresivas debido a su rápida difusión, su falta de síntomas específicos tempranos y su diagnóstico tardío (en el momento del diagnóstico, los pacientes por lo general tienen la enfermedad localmente avanzada e incluso metastásica, lo que invalida la cirugía).

El cáncer pancreático, si bien es el décimo tumor en frecuencia, representa la cuarta causa de muerte por cáncer y se prevé que para 2030 incremente su incidencia en un 50%. Alrededor del 90% de casos se deben al adenocarcinoma ductal de páncreas (ADP), muy agresivo y de mal pronóstico. (Edward J. Richards, 2013)

Quedan por dilucidar numerosos aspectos respecto al origen y al mecanismo de la carcinogénesis pancreática. Aunque se han postulado diferentes posibilidades, uno de los orígenes puede ser la transdiferenciación de células del islote o células ductales (Pour et al., 2003). Existe una serie de factores de riesgo, entre los que se encuentran el tabaquismo, la dieta alta en azúcares y grasas, la edad, el sexo, una historia clínica previa de DM o pancreatitis crónica, el alcoholismo y ciertos factores hereditarios.

### **1.3.3. FIBROSIS QUÍSTICA**

La fibrosis quística es una enfermedad genética autosómica recesiva que afecta a numerosos órganos como los pulmones, el hígado, el intestino y el páncreas.

La alteración más frecuente en los pacientes con fibrosis quística es la disfunción pancreática exocrina. La acumulación de secreciones impide el movimiento de las enzimas pancreáticas hacia el intestino y produce daños en el páncreas, a menudo acompañado de inflamación (pancreatitis), además de problemas de malabsorción, por la deficiencia de enzimas digestivas en el tracto intestinal.

#### **1.3.4. DIABETES MELLITUS**

La diabetes mellitus (DM) es un trastorno metabólico caracterizado por una concentración elevada de glucosa en la sangre (hiperglucemia) de manera crónica. Este defecto aparece acompañado de fallos en el metabolismo de hidratos de carbono, lípidos y proteínas. La DM puede estar causada por una disfunción en el mecanismo de secreción de la insulina por parte de las células  $\beta$ , por un fallo en la acción de la insulina sobre sus receptores, o por ambos defectos.

Según la Federación Internacional de la Diabetes (IDF), 386,7 millones de personas estuvieron afectadas por la DM en 2014 (en torno a un 8,3% de prevalencia mundial), convirtiéndose así en una pandemia de dimensiones planetarias. La mayoría de casos de DM diagnosticados en el mundo se engloban en dos categorías: tipo 1 y tipo 2 (DMT1 y DMT2). Además, existen otros dos tipos minoritarios de DM.

En el caso de la DMT1, la causa es una carencia absoluta de secreción de insulina debida a la destrucción por parte del sistema inmunológico de las células  $\beta$ . Esta destrucción autoinmune de células  $\beta$  presenta una importante predisposición genética, aunque aún no se conocen cuáles son los factores genéticos y ambientales que desencadenan la respuesta inmune hacia las células  $\beta$  específicamente. Esta forma de expresión de la diabetes supone alrededor del 5-10% de los casos diagnosticados.

La DMT2 se caracteriza por una combinación de la resistencia a la insulina por parte de los tejidos periféricos, que puede complicarse debido a un defecto en la compensación de la secreción de insulina por parte del páncreas. La prevalencia de esta forma de DM, que es la mayoritaria, se acerca a un 90-95% de los casos de pacientes con esta enfermedad. La DMT2, más que como una enfermedad, se entiende como un trastorno poligénico complejo en el que características genéticas se unen a la influencia de factores ambientales, en su mayoría relacionados con el estilo de vida.



Además de estas dos, otras formas de DM menos frecuentes (sobre el 2% de los casos de pacientes jóvenes con diabetes, 0,1% del total de casos) son la diabetes tipo MODY (del inglés *Maturity Onset Diabetes of the Young*), que se caracteriza porque los enfermos debutan con menos de 25 años y porque su herencia es autosómica dominante. Estas formas de DM están causadas por mutaciones en genes que provocan defectos en la función de la célula  $\beta$ . Dentro de este subtipo, nos encontramos once tipos de MODY, cada uno caracterizado por mutaciones en genes que intervienen durante el desarrollo embrionario del páncreas y que causan defectos en el adulto (Tabla 1).

MODY	GEN	NOMBRE DEL GEN	DEFECTO	REFERENCIA
MODY1	<i>HNF4a</i>	Hepatocyte nuclear factor-4a	Secreción de insulina y masa de células $\beta$	Bell GI 1991; Stoffel M. 1996
MODY2	<i>GCK</i>	Glucokinase	Detección de glucosa en célula $\beta$ , almacenamiento hepático de glucosa	Froguel P 1992
MODY3	<i>HNF1a</i>	Hepatocyte nuclear factor-1a	Secreción de insulina y masa de células $\beta$	Vaxillaire M 1995; Menzel S 1995
MODY4	<i>PDX1</i>	Pancreatic/duodenum homeobox protein 1	Regulación transcripcional en células $\beta$ y función	Stoffer DA 1997
MODY5	<i>HNF1b</i>	Hepatocyte nuclear factor-1b	Secreción de insulina y masa $\beta$ ; "quistes renales y síndrome diabético"	Horikawa 1997
MODY6	<i>NEUROD1</i>	Neurogenic differentiation 1	Regulación transcripcional en células $\beta$ y función	Malecki MT 1999
MODY7	<i>KLF11</i>	Kruppel-like-factor 11	Expresión de la insulina por defectos en la activación del promotor	Neve B 2005
MODY8	<i>CEL</i>	Carboxyl-ester lipase	Función lipasa en células acinares; "disfunción del páncreas exocrino"	Raeder H 2006
MODY9	<i>PAX4</i>	Paired box gene 4	Represión de la actividad de los promotores de la insulina y glucagón	Piengvidhya N 2007
MODY10	<i>INS</i>	Insulin	Procesamiento del gen de la insulina	Edghill EL 2008; Molven A 2008
MODY11	<i>BLK</i>	Tyrosine kinase, B- lymphocyte specific	Función de la célula $\beta$ (secreción y síntesis de insulina)	Kim SH 2004; Borowiec M 2009

**Tabla 1. Genes implicados en diabetes mellitus tipo MODY.** Adaptado de (Mastracci and Sussel, 2012)

Las DM tipo MODY se heredan de forma autosómica dominante. En el caso de mutaciones en heterocigosis en el gen *PDX1*, se produce una disfunción en la célula  $\beta$  que conlleva la aparición de una DM tipo MODY4. Sin embargo, si la mutación aparece en homocigosis se produce agenesia pancreática. Igualmente, los pacientes con mutaciones en homocigosis en *GCK* (MODY2) presentan un cuadro clínico más agresivo causado por una deficiencia congénita severa de insulina y que desemboca en una diabetes neonatal persistente.

Un caso especial de DM es la **diabetes gestacional** (DMG), definida como cualquier grado de intolerancia a la glucosa durante el transcurso del embarazo. La incidencia de la DMG es de un 3-10% de las mujeres embarazadas. Una de las consecuencias más frecuentes es un incremento de peso desproporcionado del recién nacido y una mayor probabilidad de que éste desarrolle obesidad y/o DMT2 en su vida adulta. Aunque la mayoría de los casos se resuelven favorablemente tras el parto, la definición de DMG se aplica a todos los casos a pesar de que la condición no persista.

Por último, junto con las MODY, otros defectos genéticos que afectan a la función de la célula  $\beta$  son la **diabetes neonatal**, diagnosticada en los primeros seis meses de vida y sin mostrar el patrón típico de la DMT1 y la **diabetes y sordera mitocondrial** (MIDD, del inglés *diabetes and deafness, maternally inherited*), producida por mutaciones puntuales en el ADN mitocondrial.

En cuanto al tratamiento de este trastorno metabólico, en el caso de la DMT2, la primera intervención consiste en una modificación del estilo de vida. Si esto no fuere suficiente, se recurre a fármacos antidiabéticos. Hasta la fecha, el tratamiento farmacológico para la DMT2 ha consistido en la administración de insulinosensibilizadores y secretagogos. En casos más graves se prescribe insulinoterapia, que por otra parte es imprescindible en todos los casos de DMT1. El trasplante de páncreas o bien de islotes de Langerhans aislados se ha usado con éxito en casos de DMT1, pero la falta de donantes cadavéricos ha motivado la aparición de nuevos esfuerzos para desarrollar fuentes alternativas de células  $\beta$ , como la diferenciación de células madre embrionarias o adultas en células secretoras de insulina (Soria et al., 2008).

Los recientes éxitos logrados en terapia celular para obtener células pancreáticas maduras se han basado en la aplicación de los conocimientos adquiridos en el campo de la Biología del Desarrollo (Guo and Hebrok, 2009; Mayhew and Wells, 2010; Nostro and Keller, 2012). Estos protocolos han conseguido modular las rutas de señalización y expresar los factores de transcripción observados durante el desarrollo embrionario, que se explican con detalle en el segundo apartado de esta introducción, de manera que recapitulen la organogénesis del páncreas y así

trasladar a una placa de Petri lo que ocurre en el embrión. Tanto para la consecución de este objetivo como para entender las patologías asociadas al páncreas, es necesario profundizar en el estudio de la formación y desarrollo de este órgano y, más específicamente, de las células endocrinas. En los últimos años se han llevado a cabo grandes avances en el estudio de los factores de transcripción y las rutas de señalización que controlan la formación del páncreas durante el desarrollo embrionario.

## **2. ORGANOGÉNESIS PANCREÁTICA**

Para entender mejor la fisiopatología del páncreas y poder encontrar mecanismos que nos ayuden en la terapia celular de las enfermedades pancreáticas, los investigadores han centrado sus esfuerzos en el estudio del desarrollo embrionario del páncreas. El páncreas, al igual que los demás órganos del aparato digestivo, procede de la capa germinal endodérmica. Los tejidos que forman este órgano, endocrino y exocrino, proceden de un precursor común multipotente. Durante el desarrollo pancreático, distintos mecanismos reguladores inducen la diferenciación de cada linaje pancreático. Estos mecanismos han sido extensamente estudiados en ratones, sin embargo, el conocimiento de la organogénesis pancreática en humanos es más limitado. La suposición de que los mecanismos moleculares y celulares del desarrollo están conservados entre roedores y humanos hace que los estudios en ratones proporcionen una valiosa información, si bien pueden diferir en algunos aspectos que serán discutidos a lo largo de esta introducción.

## **3. ETAPAS DEL DESARROLLO EMBRIONARIO DEL PÁNCREAS**

La formación del páncreas es un proceso complejo, regulado por un sistema de factores del desarrollo extrínsecos (moléculas de señalización de célula a célula) e intrínsecos (proteínas de unión al ADN y factores de transcripción) (Ondine Cleaver, 2010). El páncreas procede del endodermo definitivo. Su desarrollo se ha clasificado

en tres etapas, más o menos diferenciadas entre ellas, que se han designado como transiciones primaria, secundaria y terciaria (Pictet et al., 1972).

### **3.1.1. ESPECIFICACIÓN PANCREÁTICA: DESDE EL TUBO DIGESTIVO EMBRIONARIO A LA APARICIÓN DE LAS YEMAS PANCREÁTICAS Y TRANSICIÓN PRIMARIA (E8.5-12.5).**

#### Especificación pancreática

La especificación pancreática ocurre en el estadio embrionario (e) 8.5 en ratones. En este periodo embrionario, el programa pancreático comienza en una región concreta del endodermo definitivo. Inicialmente aparecen dos primordios a partir del tubo digestivo proximal embrionario, conocidos como yemas pancreáticas ventral y dorsal (Fig. 4). A pesar de que estas yemas surgen independientemente en dos localizaciones distintas del tubo digestivo, el programa molecular que dirige su especificación es similar.

Las señales extrínsecas son moléculas secretadas por células y tejidos adyacentes que inducen respuestas transcripcionales en las células diana de manera que controlan el proceso de formación del órgano. Aquellos factores extrínsecos que aparecen durante la especificación pancreática están relativamente bien definidos, siendo los principales las vías de *Fibroblast Growth Factor (FGF)*, *Bone Morphogenetic Protein (BMP)*, ácido retinoico (*Retinoic acid, RA*) y *Hedgehog (Hh)*. A diferencia de lo que ocurre en otros órganos del aparato digestivo como el hígado, el ligando de la ruta *Hh*, *Sonic hedgehog (Shh)* debe silenciarse para que se pueda iniciar el programa pancreático (Hebrok et al., 1998; Kim and Melton, 1998). La represión de *Shh* permite la expresión del factor *Pdx1*, condición indispensable para la formación del páncreas. El ácido retinoico secretado por el mesodermo que rodea el epitelio prepancreático también induce la especificación pancreática dorsal.

La región ventral del tubo digestivo anterior da lugar tanto al páncreas ventral como al hígado, que se desarrollan en contacto directo a partir de una población bipotencial común (Zorn and Wells, 2009). Estas células activan el programa

pancreático por defecto. Son las señales inhibitorias (FGFs y BMPs) secretadas por el mesodermo cardíaco adyacente las que determinan la especificación hepática frente a la pancreática (Deutsch et al., 2001; Rossi et al., 2001). Por tanto, el páncreas ventral surge de aquellas células que, debido a su localización, evitan la acción inhibitoria de los factores extrínsecos secretados por el mesodermo. Puesto que provienen de un precursor común, las células pancreáticas y hepáticas comparten muchos aspectos en su desarrollo inicial. Recientemente se ha demostrado la flexibilidad de estos programas de especificación y la capacidad de progenitores hepáticos y pancreáticos para revertir su fenotipo. Existen diversos ejemplos de conversiones entre células pancreáticas y células hepáticas revisado en (Zaret, 2008).

### Expansión y ramificación

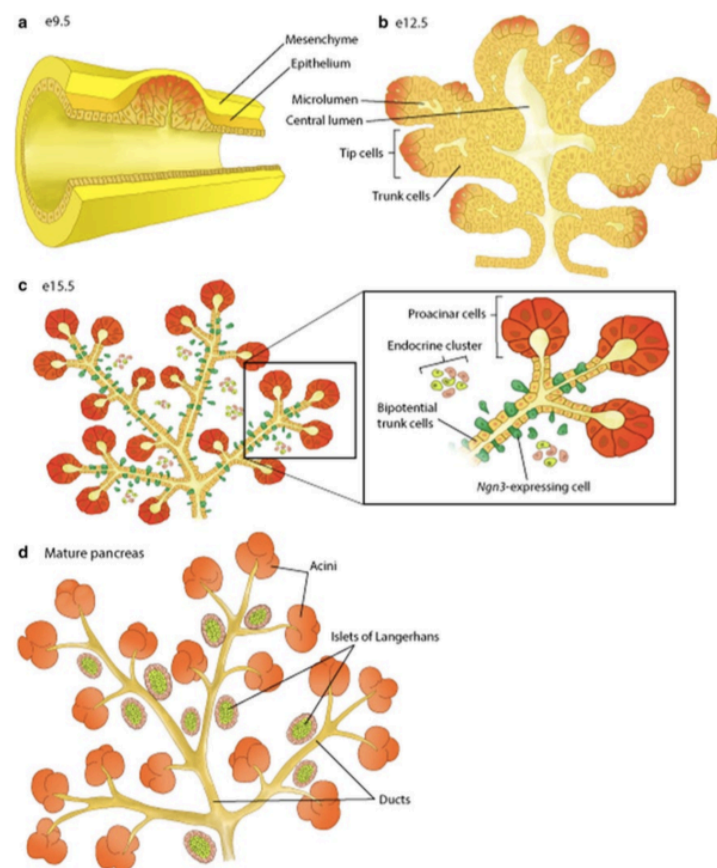
Tras la aparición de las yemas ventral y dorsal, el epitelio pancreático comienza a experimentar una serie de cambios morfológicos que se inician con la aparición de un lóbulo a partir de cada una de las yemas, que posteriormente se expandirá y ramificará, invadiendo el mesénquima adyacente y formando así un epitelio estratificado (Fig. 4) (Pictet et al., 1972).

### Transición primaria

Las células que aparecen en estos lóbulos pancreáticos están prediferenciadas hacia un destino pancreático, si bien aún mantienen la plasticidad para adquirir otro fenotipo del linaje endodérmico (Kawaguchi et al., 2002). La mayoría de las células del epitelio no adquieren el compromiso pancreático hasta la transición primaria. Esta transición está marcada por la aparición por primera vez de algunas enzimas acinares y la detección, aunque a niveles bajos, de células que expresan marcadores endocrinos como glucagón (Pictet et al., 1972). Esta primera ola de células endocrinas (e9) es característica de roedores, mientras que en humanos no se detectan células pro-endocrinas hasta estadios más avanzados en el desarrollo.

### Estadio de protodiferenciación y determinación del tamaño del páncreas

Las células epiteliales resultantes de esta transición primaria adquieren un estado de protodiferenciación. Distintas señales transcripcionales pausan en estas células los mecanismos de diferenciación y promueven una ola masiva de proliferación, necesaria para expandir el tamaño del *pool* de células progenitoras que intervendrán en la “transición secundaria” para generar células acinares, ductales e islotes. Algunos estudios en modelos animales han mostrado que el tamaño final del páncreas adulto depende directamente del tamaño de la población de progenitores protodiferenciados (Stanger et al., 2007). La ablación de una fracción de progenitores previa al e9.5 no tiene efecto sobre el tamaño final del páncreas, mientras que la eliminación de progenitores durante esta fase de expansión de protodiferenciación (e9.5-12.5) limita el tamaño del páncreas en el adulto. Es por ello que el tamaño final del páncreas dependerá directamente del número de progenitores disponibles para la segunda transición.



**Figura 4. Representación esquemática de la organogénesis pancreática en ratones.** (a) Formación del primordio pancreático comienza a partir del e9.5. (b) A e12.5, el epitelio se expande y ramifica. Comienza la segregación de los precursores pro-acinares (extremos) y pro-ductales/endocrinos (centro). (c) En el e14.5, las células localizadas en los extremos comienzan a diferenciarse en células acinares. Las células  $\text{Ngn3}^+$  se delaminan del epitelio ductal y migran para formar clústeres de células pro-endocrinas. (d) En el páncreas maduro se encuentran los tres tipos celulares distintos: acinos, ductos y células endocrinas. Adaptado de (Cano et al., 2014)

### **3.1.2. TRANSICIÓN SECUNDARIA, APARICIÓN DE PROGENITORES PANCREÁTICOS MULTIPOTENTES Y ESTABLECIMIENTO DE LOS LINAJES ENDOCRINO Y EXOCRINO (E12.5-15.5)**

El siguiente paso en la organogénesis pancreática es la conversión del epitelio protodiferenciado de progenitores pancreáticos a un epitelio dinámico que generará células acinares, ductos diferenciados y una segunda y definitiva oleada de células endocrinas que formarán los islotes. A esta segunda etapa se la denomina transición secundaria.

#### Transición secundaria y progenitores pancreáticos multipotentes

La transición secundaria se inicia a e12, mediante la aparición de células progenitoras multipotentes (MPCs, *multipotent progenitor cells*) en los extremos de las ramificaciones del epitelio (Zhou et al., 2007) (Zhou et al., 2007). Esta población de MPCs se define por la expresión de cuatro marcadores sobre los que se profundizará en el siguiente apartado, que son:

- Altos niveles de expresión de *Ptf1a*
- Pdx1
- Bajos niveles de *carboxipeptidasa A1 (Cpa1)* y ausencia de marcadores propiamente ductales como amilasa o elastasa
- Altos niveles de *c-Myc*.

Las MPCs constituyen la mayoría de células en división durante la transición secundaria, y su alto índice de replicación remodela el epitelio pancreático. La proliferación de estas células en los extremos de las ramificaciones hace que las MPCs se expandan y dejen atrás progenitores parcialmente diferenciados y con una menor tasa de replicación. A medida que el epitelio crece, los clústeres de MPCs localizadas en los extremos de las ramificaciones crean bifurcaciones que separan estas ramificaciones tubulares del epitelio en dos, de manera que las MPCs localizadas en cada uno de estos extremos continúan proliferando y expandiendo el árbol epitelial en dos direcciones distintas. (Zhou et al., 2007).

Alrededor de e14.5, la expresión de *Cpa1* no se considera como marcador de progenitores multipotentes, sino que estas células *Cpa1*<sup>+</sup> comienzan a adquirir un compromiso acinar. De este modo, las células procedentes de las MPCs que quedaron en el interior del tronco epitelial formando túbulos darán lugar a las células endocrinas y ductales, mientras que aquellas que permanecen en los extremos de las ramas ductales adquirirán un fenotipo acinar. Las células precursoras localizadas en el tronco del árbol epitelial son bipotenciales, pudiendo dar lugar a células ductales o células endocrinas. En este estadio, la tasa de replicación disminuye considerablemente y comienzan a aparecer procesos de diferenciación de forma graduada desde el centro hacia la periferia del epitelio, aunque ambos fenómenos se dan de manera solapada (Wessells, 1964).

Las MPCs son por tanto una población celular multipotente, cuya alta tasa de proliferación permite la generación de un árbol epitelial altamente ramificado durante la transición secundaria. Estos progenitores darán lugar por un lado a unos precursores acinares que se localizan en la periferia del árbol y que formarán el páncreas exocrino, y por otro a una población de células situadas en el tronco pancreático con potencial endocrino y ductal (Fig. 4).

#### Formación de los acinos

A medida que finaliza la expansión del epitelio durante la transición secundaria, las MPCs de los extremos de las ramificaciones disminuyen su tasa de proliferación y comienzan a diferenciarse hacia células acinares maduras. Para formar los acinos, las células pro-acinares alteran su posición hasta formar una estructura con forma de tapón (Fig.5) en la cual el acino engloba el extremo terminal de un ducto, incluyendo en el interior del acino células ductales denominadas células centroacinares (Motta et al., 1997).



## Desarrollo de los ductos

La formación del árbol ductal del páncreas se produce a partir de la aparición de los dos conductos pancreáticos principales que drenan al intestino. A partir de estos conductos principales aparecen conductos secundarios que se ramifican y interconectan los lóbulos del páncreas entre sí. Estos conductos van disminuyendo de calibre hasta integrarse dentro de los acinos. El páncreas es el único caso de la anatomía humana en el que las células ductales se incluyen hasta el interior del acino (Fig. 5). Estas células son las comúnmente denominadas células centroacinares, aunque realmente tienen naturaleza ductal. Algunas publicaciones sugieren el nombre de células ductales intra-acinares (Ondine Cleaver, 2010). Estas células proceden de la sección central del árbol epitelial con carácter bipotencial endocrino y ductal mencionada anteriormente.

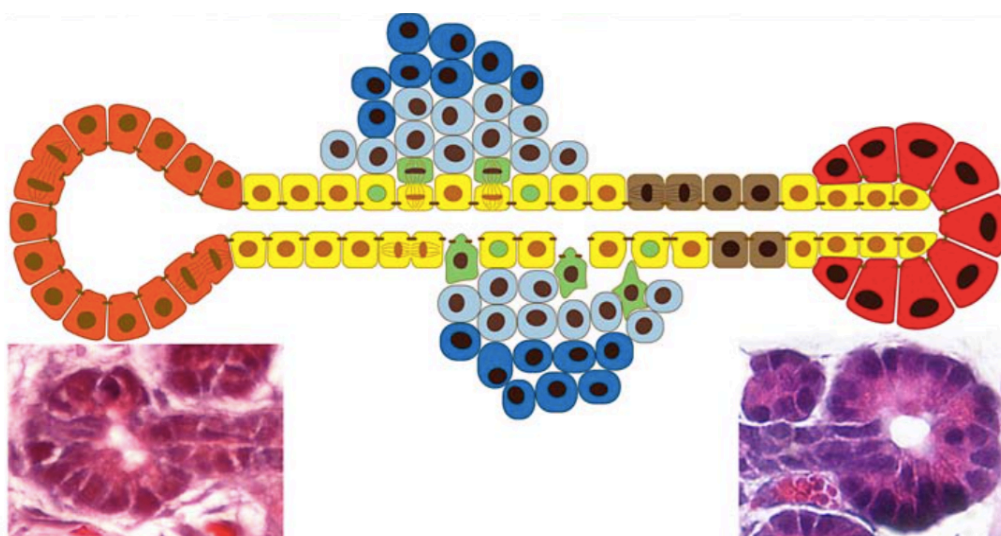
## Formación de los islotes

La población de células generadas durante la transición secundaria y localizadas en el tronco del árbol epitelial dará lugar a las células endocrinas. La expresión transitoria del factor de transcripción (FT) *Neurogenina3 (Ngn3)* induce el programa pro-endocrino en estas células. Mientras que los acinos formados en los extremos de los túbulos mantienen una continuidad con el árbol ductal, las células que formarán los islotes se van desprendiendo de los ductos (Fig. 5). Estas células pro-endocrinas se agrupan en clústeres y a medida que van madurando y adquiriendo cada destino endocrino, van aumentando en tamaño. Alrededor del islote en formación se forma una lámina basal que lo separa definitivamente del ducto. El islote maduro finalmente se localiza en el espacio extracelular entre ductos y acinos.

Dos modelos han sido propuestos para explicar la deslaminación de los precursores de los islotes del epitelio tubular. Uno de ellos es la transición epitelio-mesénquima (EMT, *epithelial-to-mesenchymal transition*), que sugiere que las células epiteliales escapan de sus adyacentes mediante la adopción de propiedades de características mesenquimales de forma transitoria. Este proceso requiere posteriormente la

regresión al estado epitelial para poder continuar con el proceso de diferenciación endocrina (Rukstalis and Habener, 2007).

El otro modelo es el denominado modelo ortogonal o de división asimétrica que propone una reorientación de las células epiteliales con respecto al plano del epitelio de manera que por división celular se libere a una de las células hijas de las uniones intercelulares de la lámina epitelial y posteriormente se diferencien en células endocrinas (Fig. 5) (Pictet et al., 1972).



**Figura 5. Modelo del proceso morfogénico para la generación de islotes, acinos y ductos en el páncreas.** En amarillo se representan los progenitores bipotenciales de islotes y ductos, que aún mantienen cierta capacidad para proliferar. En marrón se muestran las células ductales diferenciadas. En naranja (izda.), se indican las células pro-acinares aún dividiéndose, que se localizan a continuación del epitelio tubular. En el panel de abajo derecha se muestra una sección histológica de las células pro-acinares teñidas con hematoxilina-eosina. En rojo (dcha.), se muestran las células acinares ya diferenciadas englobando a células ductales centroacinares que se adentran en el acino. En el panel abajo izquierda se muestra una sección histológica de las células acinares y centroacinares teñidas con hematoxilina-eosina. En los islotes, las células verdes y azules representan precursores endocrinos que expresan Ngn3. En la parte superior se representa el modelo de división asimétrica y en la parte inferior el modelo EMT. *Adaptado de (Ondine Cleaver, 2010)*

### 3.1.3. DIFERENCIACIÓN Y MADURACIÓN (E18.5-POSTNATAL)

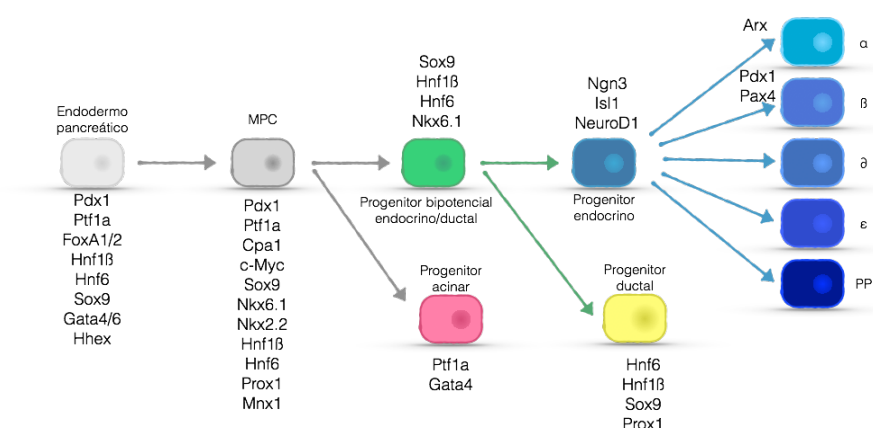
Una vez finalizada la transición secundaria y la diferenciación hacia células acinares, ductales y endocrinas, el páncreas continúa creciendo al igual que los demás tejidos del embrión. El mecanismo básico de expansión del páncreas es la proliferación del tejido exocrino situado en la periferia del órgano y de las células endocrinas

organizadas en clústeres que van adquiriendo mayor tamaño al final del periodo gestacional. La proporción de masa exocrina/endocrina aumenta considerablemente debido a la proliferación masiva que sufren las células acinares.

La aparición de los islotes de Langerhans comienza durante la transición secundaria. El agregado de células pro-endocrinas madura a lo largo de este último estadio del desarrollo hasta después del nacimiento. En el ratón, tras el nacimiento, las células productoras de glucagón comienzan a agruparse en torno a las células  $\beta$  que ocupan el centro del islote (Hara et al., 2007) formando un recubrimiento en los islotes maduros. Los clústeres de células endocrinas que delaminan del endotelio son separadas por la expansión del tejido acinar y no es hasta después del nacimiento cuando adquieren el típico aspecto esférico del islote (Pictet et al., 1972).

### 3.2. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN IMPLICADOS EN LA ORGANOGÉNESIS PANCREÁTICA.

La mayor parte del amplio conocimiento que acumulamos acerca del desarrollo del páncreas emerge del estudio del papel que juegan en él los factores de transcripción genéticamente modificados en modelos animales. Cada etapa de la morfogénesis pancreática está determinada por la expresión de un conjunto de factores de transcripción.



**Figura 6. Factores de transcripción que controlan cada uno de los estadios durante el desarrollo pancreático**

## Factores de transcripción durante la especificación pancreática

En un dominio discreto de la porción anterior del tubo digestivo primitivo surge la región pancreática definida por la expresión conjunta de los factores de transcripción (FT) *Pdx1* (*pancreatic and duodenal homeobox 1*) y *Ptf1a* (*pancreas specific transcription factor 1a*) (Chiang and Melton, 2003; Kawaguchi et al., 2002). La expresión de *Pdx1* es observada por primera vez sobre e8.5, antes de que se observe ningún cambio morfológico en el tubo embrionario, demarcando así la región prepancreática. Su expresión comienza a restringirse a las células endocrinas a medida que avanza el desarrollo. Por su lado, *Ptf1a* se expresa por primera vez a e9.5 en el dominio pancreático y a medida que avanza el desarrollo su expresión queda restringida a células acinares.

Tanto *Pdx1* como *Ptf1a* juegan papeles fundamentales desde la especificación del páncreas hasta el mantenimiento de la identidad en adultos. Estos dos factores de transcripción están incluidos en la lista de los escasos genes identificados hasta el momento cuya inactivación provoca agenesia pancreática en ratón. Del mismo modo, mutaciones en *Pdx1* o en *Ptf1a* causan hipoplasia severa de páncreas en humanos (Ahlgren et al., 1996; Kawaguchi et al., 2002; Offield et al., 1996). Más aún, la inactivación conjunta de ambos FT en el endodermo pancreático tampoco impide la especificación pancreática y estos ratones presentan un páncreas rudimentario (Burlison et al., 2008). Estos resultados sugieren que otros factores de transcripción presentes en el endodermo prepancreático, o combinaciones de éstos, fuesen los responsables de la inducción del programa pancreático en el endodermo primitivo.

Como se ha dicho, un aspecto clave en la determinación del programa pancreático es la activación de la expresión de *Pdx1*. Por ello, ha suscitado mucho interés conocer los mecanismos que controlan la expresión de este FT durante los primeros estadios de la especificación pancreática. Así, se han identificado regiones reguladoras conservadas en el promotor de *Pdx1* que dirigen su expresión a lo largo de todo el

desarrollo del páncreas. Las áreas, nombradas como I-III, dirigen la expresión de este gen en las fases más tempranas de la formación del páncreas (Gannon et al., 2001; Wiebe et al., 2007). Las áreas I y II se relacionan con la expresión en progenitores endocrinos mientras que el área III tiene un papel importante en la expresión transitoria que ocurre en células  $\beta$  (Gannon et al., 2000). Dentro de estas regiones se han identificado sitios de unión de otros factores de transcripción que activan su expresión, como el caso de HNF6 o FOXA2, aunque estos factores han resultado ser prescindibles para la formación del páncreas (Jacquemin et al., 2003; Lee et al., 2005).

Otros factores de transcripción que se expresan en el endodermo prepancreático y que podrían estar jugando un papel importante en la especificación hacia la formación del páncreas son los factores *Mnx1* (*motor and pancreas homeobox 1*), *Hhex* (*hematopoietically expressed homeobox*), *Hnf-1 $\beta$*  (*hepatocyte nuclear factor 1 $\beta$* ) y *Sox17* (*SRY sex-determining region-Y box 17*), si bien ninguno de ellos han sido directamente relacionado con la activación del promotor de *Pdx1*. Todos estos factores de transcripción se expresan ampliamente en el endodermo temprano (Zorn and Wells, 2009), por lo que se postula que la especificación pancreática pudiera no depender de un único factor de transcripción, sino más bien de una combinación de éstos.

#### Factores de transcripción durante la expansión de los MPCs y la ramificación ductal

Tras la especificación pancreática, los progenitores multipotentes (MPCs) que darán lugar a los tres linajes pancreáticos (acinar, endocrino y ductal) (Zhou et al., 2007) proliferan de tal manera que el tamaño que alcance este *pool* durante esta fase del desarrollo determinará el tamaño final del órgano adulto. Son varios los factores de transcripción que participan en la formación y el mantenimiento de la identidad de este conjunto de células. Se produce un elevado número de interacciones diferentes entre ellos, de modo que se regulan positiva y negativamente unos a otros, e incluso se autorregulan, formando una compleja red regulatoria (Fig. 6) Esta red asegura correcta la proliferación, expansión e identidad de las MPCs, que es necesaria para que la organogénesis pancreática se produzca de manera correcta.

## PDX1

Tal y como se ha descrito anteriormente, la inactivación de *Pdx1* causa agenesia pancreática. En estos ratones se consigue observar la presencia del primordio pancreático, que detiene su expansión alrededor de e10.5 (Ahlgren et al., 1996; Jonsson et al., 1994; Offield et al., 1996). Esto indica que *Pdx1* es necesario para el crecimiento y ramificación del epitelio, no así para la especificación pancreática. Dentro de la red de regulación transcripcional en la población de MPCs, *Pdx1* regula de manera directa a *Gata4*, *FoxA2* y *Hnf1β* mediante la activación con sus regiones reguladoras (Oliver-Krasinski et al., 2009; Rojas et al., 2009).

## PTF1A

La inactivación de *Ptf1a* conduce a la agenesia pancreática. Sin embargo, el programa pancreático llega a iniciarse ya que se llega a formar la yema ventral (Kawaguchi et al., 2002). Estos resultados sugieren que PTF1A es esencial para la expansión y diferenciación de los progenitores pancreáticos. Estudios recientes han identificado numerosas dianas transcripcionales de PTF1A que se expresan en la población MPCs como *Pdx1*, *Nkx6.1*, *Hnf6* o *Mnx1* (Thompson et al., 2012).

## SOX9

*Sox9* se expresa en el dominio de *Pdx1* desde e9.5 en células progenitoras de todos los tipos pancreáticos (Seymour et al., 2007). Durante la transición secundaria, *Sox9* restringe su expresión a los progenitores bipotenciales que darán lugar a células endocrinas y ductales. A medida que avanza el desarrollo, su expresión sólo se mantiene en células ductales. La inactivación condicional de *Sox9* en el dominio de *Pdx1* causa una hipoplasia pancreática severa (Seymour et al., 2007), debido a una disminución de la proliferación de las MPCs y a un aumento de la muerte celular. Además SOX9 también participa en el mantenimiento de la identidad de los MPC a través de un mecanismo que implica la señalización mesenquimal mediada por factores de crecimiento fibroblásticos (*Fibroblast Growth Factor*, FGF) (Seymour et al., 2012). SOX9 es un regulador de la expresión del receptor 2b del FGF (*Fgfr2b*) en el

epitelio pancreático. Este receptor media en la traducción de la señal mesenquimal de FGF10. Además, FGF10 es necesario para mantener la expresión de *Sox9* y *Fgfr2b*, con lo que estos tres elementos forman un circuito retroalimentado en la población de MPCs que es necesario para mantener su identidad, de tal modo que la interrupción de este circuito da lugar a la activación del programa de desarrollo hepático en los progenitores pancreáticos. SOX9 regula directamente la expresión de otros FT propios de las MPCs como *Hnf1β*, *Hnf6* y *FoxA2*, colocando a SOX9 en un papel central en la red transcripcional que controla las MPCs (Lynn et al., 2007).

### HNF1β

*Hnf1β* se expresa en la parte anterior del tubo digestivo embrionario y su expresión es anterior a *Pdx1* (Coffinier et al., 1999). Más adelante en el desarrollo pancreático, su expresión se observa sólo en células ductales (Maestro et al., 2003). Los mutantes *Hnf1β* fenocopian los defectos de los mutantes *Ptf1a*, con reducción del tamaño de la yema dorsal y ausencia de la yema ventral. De hecho, los niveles de *Ptf1a* no son detectables en el mutante *Hnf1β*, sugiriendo que PTF1A actúa aguas abajo de HNF1β (Haumaitre et al., 2005).

### HNF6

*Hnf6* se expresa en la región central y anterior del tubo digestivo embrionario. Se encuentra en progenitores pancreáticos pero su expresión va quedando restringida a las células acinares y ductales en la etapa perinatal. (Maestro et al., 2003; Zhang et al., 2009). Los ratones deficientes en *Hnf6* presentan hipoplasia pancreática acompañada de una disminución de los niveles de *Pdx1* (Jacquemin et al., 2003). HNF1β regula la expresión de *Hnf6* y se ha propuesto activación secuencial de *Hnf1β*, *Hnf6* y *Pdx1* para la regulación de la especificación pancreática (Poll et al., 2006).

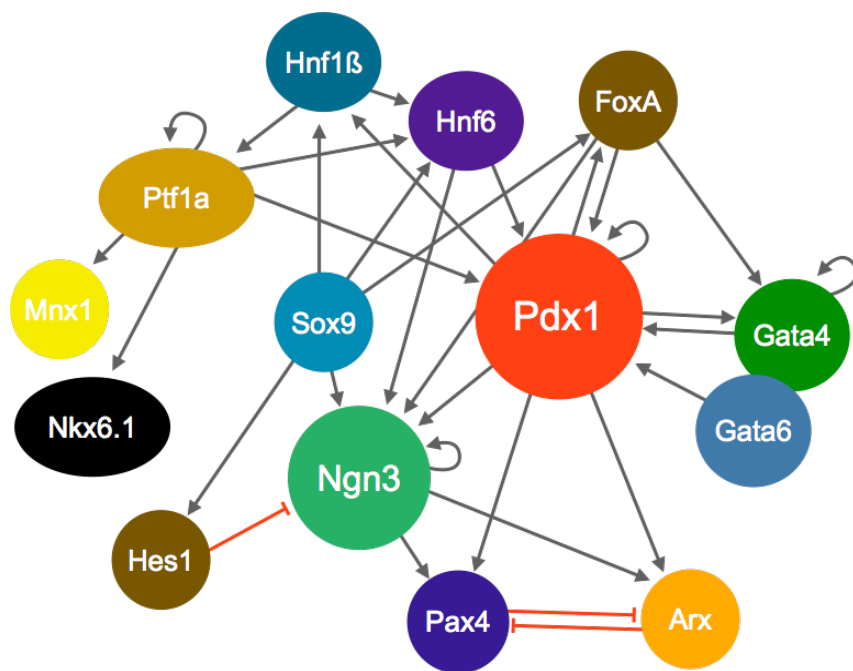
### MNX1

*Mnx1* es otro de los factores de transcripción que se expresa ampliamente a lo largo del tubo digestivo embrionario a e8. Se expresa de forma amplia en todo el epitelio pancreático hasta e12.5. En este estadio, su expresión disminuye drásticamente y vuelve a expresarse en células β adultas. Su inactivación conlleva la agenesia del

páncreas dorsal; sin embargo, no afecta al páncreas ventral. (Harrison et al., 1999; Li et al., 1999).

#### Factores FOXA

Los factores de transcripción FOXA1 y FOXA2 se expresan en los primordios pancreáticos y mantienen su expresión en todos los tipos celulares pancreáticos durante todo el desarrollo embrionario hasta la vida adulta (Lee et al., 2005). Estos factores juegan un papel redundante durante el desarrollo pancreático, de manera que la inactivación individual de cada uno de los miembros FOXA en el dominio de expresión de *Pdx1* no afecta a la formación del páncreas. Sin embargo, la inactivación conjunta de ambos factores conduce a una hipoplasia pancreática severa (Gao et al., 2008). Este fenotipo se podría deber a una disminución de la expresión de *Pdx1* en la población MPCs, ya que FOXA1 y FOXA2 son factores necesarios para la activación de *Pdx1* en los primeros estadios del desarrollo.



**Figura 7. Interacciones dentro de la red reguladora entre factores de transcripción implicados en el desarrollo pancreático.** Las flechas indican interacciones directas.



## Factores de transcripción claves en el establecimiento de los linajes exocrino y endocrino

Alrededor del estadio embrionario e12.5 y 15.5 del ratón, el epitelio pancreático sufre un proceso de expansión de las MPCs y de ramificación del epitelio. A medida que estas células se expanden, comienza el proceso de establecimiento de los linajes exocrino, endocrino y ductal. Tal como se explica en el apartado anterior, el epitelio se separa en dos dominios diferenciados: los extremos, que darán lugar al páncreas exocrino y el centro, en los que se encuentran progenitores bipotenciales ductales/endocrinos. Estos dos dominios se pueden definir por la expresión específica de factores de transcripción. Mientras que *Ptf1a* mantiene su expresión en las células de los extremos y se apaga en el resto del epitelio, *Sox9*, *Hnf1b* y *Nkx6.1* quedan restringidos al tronco central del árbol epitelial (Kopp et al.; Solar et al., 2009; Zhou et al., 2007). El mecanismo por el que se establece la localización de estos dos dominios se basa en la acción contraria de PTF1A y los factores NKX6 (NKX6.1 y NKX6.2), de manera que mutuamente antagonizan la acción del otro para así especificar los linajes exocrino y ductal/endocrino, respectivamente (Schaffer et al., 2010).

Durante la transición secundaria, algunas células dispersas a lo largo del tronco epitelial expresan durante este estadio el factor regulador de la especificación endocrina, *Neurogenina 3* (*Ngn3*). Estas células *Ngn3*<sup>+</sup> actúan como progenitores endocrinos, y se separan del epitelio ductal para formar clústeres de células que continúan proliferando y diferenciándose. La expresión de *Ngn3* se observa sobre e9.5, pero es el pico de expresión que se expresa durante esta segunda transición lo que determina el inicio del proceso de diferenciación endocrina (Schwitzgebel et al., 2000). NGN3 es imprescindible para la formación del páncreas endocrino, de tal manera que su inactivación conduce a la pérdida de todas las células endocrinas, pero no afecta al desarrollo acinar (Gradwohl et al., 2000). Experimentos de trazado

de linaje han demostrado que todas las células endocrinas proceden de un progenitor *Ngn3*<sup>+</sup> (Gu et al., 2002).

La regulación de la expresión de NGN3 es compleja y en ella participan diferentes factores de transcripción, formando una red que incluye a la propia NGN3, FOXA2, GLIS3, HNF1 $\beta$ , HNF6, PDX1 y SOX9 (Ejarque et al., 2013) (Arda et al.; Lee et al., 2001; Lynn et al., 2007; Oliver-Krasinski et al., 2009). Del mismo modo, el papel que juega este factor clave en la inducción del programa endocrino implica la activación de ciertos factores de transcripción como *Neurod1*, *Pax4*, *Insm1*, *Rfx6*, *Nkx2.2* y *Myt1* (Arda et al.; Gasa et al., 2004; Huang et al., 2000; Smith et al., 2003; Smith et al.; Soyer et al.; Watada et al., 2003) .

#### Diferenciación hacia células endocrinas

Son varios los factores de transcripción implicados en la diferenciación, supervivencia y maduración en el desarrollo de los progenitores endocrinos. Entre los genes regulados por NGN3, *Rfx6* (*Regulatory X-box binding 6*) interviene en la formación de los islotes, ya que el ratón deficiente para este factor presenta una disminución dramática de todas las células endocrinas, excepto de células PP (Smith et al.; Soyer et al.). Otra familia de factores, como la familia NKX, también está implicada en la diferenciación endocrina. Los parálogos *Nkx6.1* y *Nkx6.2* juegan un papel redundante en la diferenciación endocrina, y el doble mutante presenta una reducción importante de células  $\alpha$  y  $\beta$  (Henseleit et al., 2005). La inactivación de otro miembro de la familia, *Nkx2.2*, también provoca una disminución de células  $\alpha$  y PP y una ausencia total de células  $\beta$  (Sussel et al., 1998).

Los factores de transcripción *Pax4* y *Arx* juegan un papel antagonista en la diferenciación y especificación hacia célula  $\beta$  y  $\alpha$  respectivamente (Collombat et al., 2003). La inactivación de *Pax4* conlleva una reducción de la población de células  $\beta$  y  $\delta$  (Collombat et al., 2003). La expresión ectópica de *Pax4* en MPCs induce la formación de células  $\beta$ , mientras que la activación ectópica de *Arx* induce la diferenciación hacia células de los progenitores pancreáticos (Collombat et al., 2007; Collombat et al.,

2003; Collombat et al., 2009). De este modo, *Pax4* dirige la formación de células  $\beta$  y  $\delta$  mientras que *Arx* lo hace con las células  $\alpha$  a expensas de células  $\beta$  y  $\delta$ .

*Pdx1* también juega un papel crucial en la formación de células  $\beta$  maduras. La sobreexpresión de *Pdx1* en progenitores endocrinos induce la formación de células  $\beta$  y una disminución de células  $\alpha$  (Yang et al.). Por el contrario, su inactivación en este estadio provoca un aumento de células  $\alpha$  (Gannon et al., 2008). La inactivación de *Pdx1* en células adultas causa, además de una disminución de la masa de células  $\beta$ , una bajada de amilina/IAPP, una pérdida de la expresión de la insulina y una desregulación del transportador de glucosa *Glut2* (Ahlgren et al., 1998; Holland et al., 2005; Thomas et al., 2000).

### Diferenciación ductal

Las células ductales provienen de una población bipotencial endocrino/ductal. La expresión de *Ngn3* en células dispersas a lo largo del epitelio pancreático pone en marcha el programa genético endocrino. Al igual que sucede durante la expansión de los progenitores multipotentes, el factor de transcripción HES1 es un inhibidor de la expresión de *Ngn3* durante esta etapa de diferenciación endocrina y ductal. Se ha sugerido que aquellas células que expresan altos niveles de HES1 y SOX9 se dirigen hacia el linaje ductal, mientras que aquellas que sólo expresen SOX9, a través de la activación transcripcional de *Ngn3*, ponen en marcha el programa genético endocrino. Los mecanismos que determinan la diferenciación hacia células ductales no han sido estudiados en profundidad, aunque son varios los factores que parecen estar implicados en la formación y el desarrollo de este compartimento, como son SOX9, HES1, HNF1 $\beta$ , HNF6 y PROX1. Curiosamente, estos factores también son activadores de *Ngn3*, sugiriendo un doble papel en ambos linajes pancreáticos.

### Diferenciación exocrina

PTF1A es el factor de transcripción clave durante la diferenciación acinar. El proceso de diferenciación se inicia por el intercambio de la subunidad de unión al ADN RBPJ

por RBPJL. La formación de este nuevo complejo PTF1A-RBP-JL es lo que inicia la activación de genes específicos acinares (Esni et al., 2004; Masui et al.). PDX1 también juega un papel importante en la diferenciación exocrina. Si bien su inactivación no bloquea la especificación acinar, sí se ve comprometida la diferenciación, pues su inactivación a partir de e13.5 provoca la aparición de acinos inmaduros (Hale et al., 2005).

Otros factores como *Mist1* y *Nr5a2* se expresan específicamente durante la diferenciación acinar y, aunque su función no es fundamental para el desarrollo acinar, juegan un papel importante en la maduración y homeostasis de los acinos adultos (Martinelli et al.; von Figura et al.).

#### **4. DIFERENCIAS ENTRE EL DESARROLLO EMBRIONARIO PANCREÁTICO EN HUMANOS Y RATONES**

A pesar de la complicación que supone el estudio del desarrollo embrionario en humanos, limitado por la dificultad de obtener tejidos fetales que hagan posible estudios histológicos, en los últimos años se ha avanzado en el conocimiento de cómo se desarrolla el páncreas en humanos. Recientemente, se han realizado trabajos utilizando células madre humanas que al confrontar los datos con los obtenidos a partir de tejidos humanos embrionarios arrojan luz al desarrollo pancreático en humanos (Cebola et al., 2015; Jennings et al.). Estos estudios confirman que el desarrollo pancreático está altamente conservado entre humanos y ratones. De hecho, todos los factores de transcripción clave que aparecen durante el desarrollo en ratón están presentes en el desarrollo pancreático humano (Jennings et al.) y comparten mecanismos parecidos.

Trabajos recientes centrados en el estudio de asociación del genoma completo (en inglés, *GWAS*, *Genome-wide association study*) han identificado variantes a lo largo del genoma que conducen a la instauración de DMT2. Muchas de estas mutaciones están asociadas a procesos que suceden durante el desarrollo embrionario y se localizan cerca de los genes cuyas mutaciones causan diabetes monogénica

(Replication et al., 2014; Travers et al., 2013). En la actualidad se están localizando cada vez más alteraciones asociadas a esta patología en las secuencias reguladoras de estos genes. Estas secuencias reguladoras están peor conservadas que las secuencias codificantes de los genes que regulan (Weedon et al., 2014), con lo que se dificulta el estudio de estas mutaciones en organismos modelo como el ratón.

Los procesos que ocurren durante el desarrollo pancreático y el patrón de expresión de los factores de transcripción son generalmente similares en humanos y ratones (Jennings et al.). Sin embargo, hay ciertas diferencias significativas. Las primeras células endocrinas diferenciadas aparecen más tarde en humanos que en ratones. Esto se debe a la ausencia de la primera oleada de células endocrinas que aparecen en la transición primaria en ratones. Del mismo modo, el patrón de expresión de ciertos FT varía (por ejemplo, el retraso en la aparición de *PDX1* en humanos con respecto al ratón, alrededor de la etapa embrionaria de Carnegie (CS) 12 (Jennings et al.)). La expresión del gen pro-endocrino *NGN3* está presente en el desarrollo humano en una sola fase y no durante dos etapas como sucede en ratones (Capito et al., 2013). El patrón de expresión de *MAFB* tampoco es completamente equivalente (Jennings et al.).

Estudios genéticos que asocian defectos pancreáticos en humanos a mutaciones en genes claves apoyan la idea de que los programas regulatorios que controlan el desarrollo embrionario del páncreas están conservados en humanos y ratones. Por ejemplo, mutaciones en *Pdx1* o en *Ptf1a* también producen agenesia pancreática, y mutaciones en *NGN3* producen diabetes neonatal permanente (Jensen et al., 2007; Sellick et al., 2004; Stoffers et al., 1997; Wang et al., 2006). Estos fenotipos son consistentes con las funciones atribuidas a estos factores transcripcionales en estudios realizados en ratones.

## 5. LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN GATA

Recientemente, los factores GATA han sido identificados como factores clave en la formación del páncreas tras la identificación de mutaciones en los genes *GATA6* y *GATA4* relacionados con casos de agenesia y defectos pancreáticos en humanos. Estos dos factores de transcripción pertenecen a la familia de factores de transcripción de dedos de zinc GATA, que en vertebrados comprende seis miembros. Todos ellos reconocen un mismo sitio de unión A/T-GATA-A/G en las regiones reguladoras de diversos genes (Patient and McGhee, 2002). Los miembros GATA1, GATA2 y GATA3 contribuyen a la diferenciación hematopoyética, mientras que GATA4, GATA5 y GATA6 están implicados en la especificación y diferenciación de numerosos tejidos derivados del endodermo y del mesodermo (Bresnick et al.; Molkentin, 2000). La expresión de GATA4 y GATA6 permanece en distintos órganos en estadios adultos.

Numerosos estudios de la última década o incluso anteriores han mostrado una clara asociación de mutaciones en *GATA4* o en *GATA6* con malformaciones cardíacas en humanos (Garg et al., 2003; Kodo and Yamagishi; Lin et al.; Maitra et al.). Sin embargo, dado el amplio patrón de expresión de estos factores en distintos órganos y linajes celulares, sorprende que no se describiese ninguna otra anomalía extra-cardíaca en estos pacientes. Estudios mucho más recientes han relacionado por primera vez mutaciones en el gen *GATA6* con casos de agenesia pancreática (Lango Allen et al.; Suzuki et al., 2014). El Dr. Andrew Hattersley y colaboradores han demostrado que más del 50% de los casos de agenesia pancreática se deben a mutaciones en el gen *GATA6*. Los análisis de secuenciación masiva de una cohorte de pacientes que presentaba defectos en la formación del páncreas, ya fuese agenesia o hipoplasia severa, revelaron mutaciones *de novo* en el gen *GATA6* en 15 de los 27 pacientes examinados. Estas mutaciones se encontraban siempre en heterocigosis y dentro de las regiones codificantes del gen. Estos estudios han sido ampliados con un número mayor de pacientes, corroborando el papel fundamental de *GATA6* en la organogénesis pancreática (De Franco et al.). Más aún, estos estudios también revelaron que ciertas mutaciones no tenían efecto en la formación del páncreas pero

los individuos que las presentaban desarrollaron diabetes mellitus en la edad adulta. Esta diabetes podía ir acompañada o no de insuficiencia exocrina. A partir de estos datos, es necesario profundizar en las familias con mutaciones en *GATA6* y así proponer este gen como causa de diabetes monogénica en adultos.

Recientemente, también se han vinculado mutaciones *de novo* en el locus de *GATA4* y casos de diabetes neonatal e infantil (Shaw-Smith et al., 2014), con un amplio espectro de fenotipos, que incluye la agenesia pancreática. En algunos de los casos citados, estas mutaciones también se relacionaron con malformaciones cardíacas congénitas.

Todas estas investigaciones sitúan a la familia *GATA* en la exclusiva lista de genes cuya inactivación causa agenesia pancreática en humanos, junto con *PDX1* y *PTF1A*. Desafortunadamente el conocimiento del patrón de expresión de los factores *GATA* a lo largo del desarrollo humano es limitado, y difiere del observado en el embrión de ratón. *Gata6* se expresa durante un breve periodo en los progenitores pancreáticos durante el periodo de expansión de los MPCs (CS16-18) (Cebola et al., 2015). Por su parte, *GATA4* se detecta en CS12 en el endodermo prepancreático y se mantiene en los progenitores hasta que comienza a restringir su expresión a las células CPA1<sup>+</sup> a medida que progresa el desarrollo (Jennings et al.).

En ratones, distintos estudios ponen de manifiesto la coexpresión de ambos genes, *Gata4* y *Gata6*, en el tubo digestivo embrionario así como en los primeros estadios de la formación del páncreas (Decker et al., 2006). A medida que la organogénesis pancreática progresa, la expresión de *Gata4* queda restringida al compartimento acinar, mientras que por su parte *Gata6* mantiene su expresión en islotes, acinos y ductos. Diversos estudios han intentado dilucidar el papel de *GATA4* y *GATA6* en la formación del páncreas, pero la temprana letalidad de los ratones *Gata4 knockout* y *Gata6 knockout* lo han impedido. El ratón nulo para *Gata4* (*knockout* convencional en la línea germinal) muere alrededor de e8.5 debido a defectos en el tejido extraembrionario, así como fallos en la formación del corazón y el tubo digestivo (Kuo et al., 1997; Molkentin et al., 1997). Por otro lado, el ratón *Gata6 knockout* no es

capaz de progresar más allá de la gastrulación debido a defectos en el saco embrionario y muere prematuramente alrededor de e5.5 (Koutsourakis et al., 1999). Para circundar la letalidad embrionaria causada por la expresión extraembrionaria de estos factores GATA, se llevaron a cabo experimentos para el rescate de esta letalidad mediante técnicas de complementación tetraploide, de manera que el embrión *knockout* estuviese provisto de un saco embrionario silvestre. En estos estudios se puso de manifiesto la incapacidad de estos ratones para iniciar el programa de especificación pancreática (Watt et al., 2007). Sin embargo, este abordaje presenta el inconveniente de que no distingue entre un posible papel autocrino de un posible efecto paracrino de los factores GATA sobre el propio epitelio pancreático. *Gata4* también se expresa en tejidos adyacentes al endodermo prepancreático y la inactividad de GATA4 en estos tejidos podría tener efectos negativos de forma paracrina sobre el desarrollo pancreático. En otros estudios de pérdida de función de estos factores en el epitelio pancreático se han sobreexpresado GATA4 y GATA6 fusionados al dominio represor de la proteína *Engrailed* de *Drosophila melanogaster* bajo el control del promotor de *Pdx1*. En este caso, los ratones carecían de tejido pancreático, o bien presentaban un páncreas hipoplástico (Decker et al., 2006). Estos estudios también presentan como limitación la falta de cuantificación de los niveles de expresión de los transgenes *GATA4-Engrailed* y *GATA6-Engrailed*. Aún así, todos estos antecedentes en modelos animales y los estudios realizados en humanos apuntan a un presumible papel importante de los factores GATA en el desarrollo embrionario del páncreas. En esta tesis, estudiamos el papel que juegan GATA4 y GATA6 en la organogénesis pancreática.

Con respecto al papel que juegan en el adulto, un trabajo reciente ha mostrado que la inactivación condicional del gen *Gata6* mediante el uso de un ratón *Ptf1a-Cre* no tiene efecto en la formación del páncreas, pero ha puesto de relieve el papel del factor GATA6 para la maduración del páncreas acinar, así como para el establecimiento de la polaridad en células acinares adultas. La inactivación condicional de *Gata6* en los progenitores pancreáticos conduce a una pérdida masiva de células acinares en ratones adultos de más de 30 semanas. Este fenotipo va acompañado además de un aumento de la apoptosis y proliferación en estas



células, una transdiferenciación hacia tejido adiposo y la aparición metaplasias acino-ductales (Martinelli et al., 2013). Los islotes de estos ratones tienen una morfología aparentemente normal y no tienen afectada su función endocrina, ya que responden a alta dosis de glucosa de forma similar a los ratones control. Estos estudios contrastan con los estudios en humanos, donde mutaciones en *GATA6* se asocian con defectos de función endocrina y desarrollo de diabetes en estadios adultos no asociados a agenesia pancreática. En esta tesis trataremos de dilucidar el papel de *GATA6* en la función pancreática, tanto en el componente acinar como en el endocrino.

## II.OBJETIVOS

El objetivo global de esta tesis es dilucidar los mecanismos moleculares y celulares que controlan la organogénesis pancreática y la función en el páncreas adulto con especial énfasis en el papel de los factores de transcripción GATA. Estos estudios nos ayudarán a entender mejor ciertas enfermedades asociadas a defectos en la formación y función del páncreas en humanos.

Más específicamente, los objetivos de esta tesis son:

**OBJETIVO 1. ESTUDIAR LA CONTRIBUCIÓN DE LOS FACTORES GATA4 Y GATA6 AL DESARROLLO EMBRIONARIO DEL PÁNCREAS**

Mediante el uso de modelos condicionales de ratón hemos inactivado individualmente y de forma conjunta los genes *Gata4* y *Gata6* en el endodermo pancreático. Estos resultados nos han permitido descifrar la red transcripcional en la cual los factores GATA participan para el correcto desarrollo del páncreas. Ahora podemos entender a nivel molecular la agenesia pancreática observada en humanos con mutaciones en los genes *GATA6* o *GATA4*.

**OBJETIVO 2. ESTUDIAR LA CONTRIBUCIÓN DE GATA6 A LA REGENERACIÓN DEL TEJIDO PANCREÁTICO ACINAR**

Hemos estudiado la contribución de GATA6 en la regeneración acinar usando modelos de inducción de pancreatitis mediante la administración de ceruleína en ratones deficientes en dicho factor de transcripción. Estos estudios nos permitirán entender los defectos de insuficiencia exocrina observados en humanos con mutaciones en *GATA6*.

**OBJETIVO 3. ESTUDIAR EL PAPEL DE GATA6 EN LA FUNCIÓN ENDOCRINA DEL PÁNCREAS**

Hemos analizado la capacidad de los ratones deficientes en *GATA6* de responder a altas dosis de glucosa. Estos experimentos nos ayudarán a

entender los mecanismos moleculares subyacentes al desarrollo de la diabetes en humanos que tienen mutaciones en el gen *GATA6*.

**Nota aclaratoria:**

Los resultados obtenidos en esta tesis sobre el papel de los factores *GATA4* y *GATA6* en el desarrollo pancreático (Objetivo 1) han sido publicados en la revista *Journal of Clinical Investigation*. En el mismo número de la revista y a continuación de nuestra publicación (*back to back*), también se ha publicado un estudio similar realizado por el laboratorio de la Dra. Lori Sussel (Universidad de Columbia, Nueva York, EE.UU.). Los resultados y conclusiones del trabajo de ambos laboratorios son idénticos y complementarios, reforzando así el papel crucial de estos factores de transcripción en la organogénesis pancreática.



### III.MATERIALES Y MÉTODOS

## 1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

### 1.1. ANIMALARIO Y PROTOCOLOS DE MANIPULACIÓN DE ANIMALES

Los ratones usados como modelo de experimentación en esta tesis se alojaron en la Unidad de Recursos Biológicos del Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER). Los animales se mantuvieron en condiciones de humedad y temperatura controladas en racks ventilados, con ciclos de 12 horas de luz/oscuridad. Durante todo el estudio, los animales tuvieron acceso libre a agua y alimento (pienso 2914 irradiado T.2914.4X4.5R, Harlan), salvo requerimientos específicos en determinados experimentos.

Todos los protocolos de manipulación de animales, incluyendo eutanasia y sacrificio, se realizaron bajo la guía de legislación de la Comunidad Europea y fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal del CABIMER.

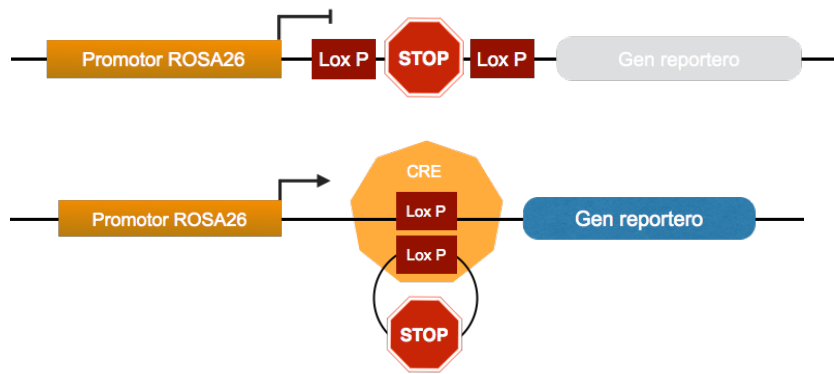
Las técnicas utilizadas para la determinación del genotipo de cada uno de los ratones usados en este trabajo se especifican en el apartado 2.1 y 2.2 de este apartado de Materiales y Métodos.

El fondo genético de todos los ratones usados en esta tesis es C57BL/6, salvo que en su descripción se indique lo contrario.

### 1.2. LÍNEAS DE RATONES CON GENES REPORTEROS

#### 1.2.1. LÍNEA DE RATÓN *ROSA26R-LacZ*

Los ratones *Rosa26R-LacZ* fueron obtenidos a través de **Jackson Laboratories**, (Maryland, EEUU, ref. 9427). Estos ratones contienen en homocigosis el gen *LacZ* cuya expresión está bloqueada por tres codones de STOP delante del gen reportero *LacZ* (Soriano et al, 1999). Mediante la acción de la recombinasa Cre, las secuencias comprendidas entre los sitios LoxP, incluyendo los codones de STOP, son escindidas y por tanto se permite la expresión gen *LacZ* en aquellos tejidos donde la recombinasa Cre actúe (Fig. 8). Estos ratones tienen un fondo genético híbrido C57BL/6 x FVB/N.



**Figura 8. Representación esquemática del transgén ROSA26R acoplado a un sistema reportero.** Los codones de STOP bloquean la expresión del gen reportero (LacZ). Mediante la acción de la recombinasa Cre se escinden los codones de STOP, permitiendo la expresión de los genes reporteros.

### 1.2.2. LÍNEA DE RATÓN *Pdx1-LacZ*

Los ratones transgénicos *Pdx1-LacZ* (*wt*) tienen integrado en su genomio el gen *LacZ* bajo el control del promotor del gen *Pdx1*, desde la posición 4690 aguas arriba del inicio de la transcripción hasta la posición 41 aguas abajo. Este fragmento de 4731 pares de bases (pb) contiene dos sitios de unión para factores GATA. Los ratones transgénicos *Pdx1-LacZ* (*Gmut*), contienen el mismo transgén que los ratones *Pdx1-LacZ* (*wt*) pero con los sitios GATA mutados. La estrategia de clonación para la generación de ambos transgenes se detalla en el apartado 4.2.2. Los fragmentos que contienen la secuencias silvestres o mutados del promotor *Pdx1* fusionados al gen *LacZ* fueron separadas del resto del vector mediante la digestión con las enzima de restricción *SpeI* (15443-013, Life Technology) y *Hind III* (15207-012, Life Technology). Los fragmentos fueron separados del esqueleto del vector por electroforesis en un gel de agarosa (A9539-250G, Sigma-Aldrich), purificados de la agarosa (*Favorprep GEL/PCR Purification Kit*, FAGCK001-1, Favorgene) y resuspendidos en buffer Tris-HCl 5 mM, EDTA 0.2 mM (pH 7.4) a una concentración final de 2 µg/mL para su microinyección en ovocitos fecundados de ratones de la cepa FVB/N mediante el procedimiento previamente descrito (Hogan et al., 1994). Ambas líneas transgénicas fueron generadas en el Servicio General de Producción y Experimentación Animal de la Universidad de Sevilla (Espartinas, Sevilla).



### Líneas fundadoras *Pdx1*-wt-*LacZ*

Se generaron y establecieron tres líneas independientes de ratones transgénicos con las secuencias silvestres de *Pdx1* fusionadas al gen reportero *LacZ*. Estas líneas *Pdx1*-wt-*LacZ* fueron nombradas con el número del fundador de la línea (F<sub>0</sub>7, F<sub>0</sub>134, F<sub>0</sub>135). El patrón de expresión espacial y temporal del gen *LacZ* fue idéntico en las tres líneas transgénicas independientes.

### Líneas fundadoras *Pdx1*-mut-*LacZ*

Asimismo, se establecieron dos líneas de ratones transgénicos con las secuencias GATA mutadas del promotor de *Pdx1*. Estas líneas de ratones *Pdx1*-mut-*LacZ* fueron denominadas como F<sub>0</sub>4 y F<sub>0</sub>10.

## **1.3. LÍNEAS DE RATONES FLOXEADOS**

### **1.3.1. *GATA4*<sup>FLOX/FLOX</sup>**

Los ratones *Gata4*<sup>flox/flox</sup> (*Gata4*<sup>tm1.1Sad/J</sup>) fueron generados en el laboratorio del Dr. Stephen A. Duncan, (Medical College of Wisconsin, EE.UU.) y están disponibles en Jackson Laboratories, (Maryland, EE.UU, ref. 8194). Estos ratones presentan en homocigosis sitios LoxP que flanquean los exones 3-5 del gen *Gata4* (Fig. 2). Presentan un fondo genético híbrido (CD1 x 129S1/SvImJ) (Watt et al., 2007).

### **1.3.2. *GATA6*<sup>FLOX/FLOX</sup>**

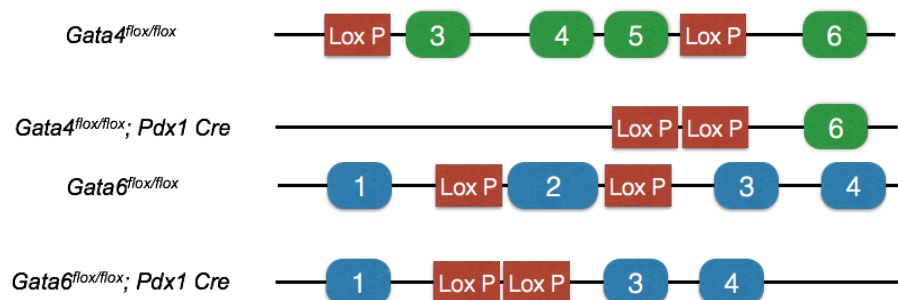
Los ratones *Gata6*<sup>flox/flox</sup> (*Gata6*<sup>tm2.1Sad/J</sup>) se generaron bajo la dirección del Dr. Stephen A. Duncan en el Medical College of Wisconsin, EE.UU. y están disponibles en Jackson Laboratories (Maryland, EE.UU., ref. 8196). Los ratones homocigotos para el alelo condicional *Gata6*<sup>flox/flox</sup> presentan sitios LoxP que flanquean el exón 2 del gen (Sodhi et al., 2006) (Fig. 2).

## **1.4. LÍNEAS DE RATONES TRANSGÉNICOS CON LA RECOMBINASA *CRE*: *PDX1-CRE***

La línea *Pdx1-Cre* utilizada en esta tesis fue desarrollada por el Dr. Andrew M. Lowy, (Universidad de San Diego, EE.UU.) y se obtuvo del repositorio de Jackson Laboratories (Maryland, EE.UU., ref. 14647). En esta línea de ratones transgénicos la recombinasa *Cre* se expresa bajo el control del promotor de ratón *Pdx1* (4,5 Kb aguas arriba del inicio de la transcripción). Esta región promotora es suficiente para recapitular la expresión de *Pdx1* desde estadios muy tempranos en el desarrollo pancreático hasta su expresión en células beta adultas de los islotes de Langerhans. Los ratones *Pdx1-Cre* tienen un fondo genético híbrido (C57BL/6 x FVB/N). Cuando la línea *Pdx1-Cre* se cruza con una línea transgénica que contiene secuencias flanqueadas por sitios *LoxP*, la recombinación mediada por la recombinasa *Cre* resulta en la escisión de las secuencias comprendidas entre los sitios *LoxP* en el endodermo prepancreático (Gu et al., 2002).

### 1.5. GENERACIÓN DE RATONES *GATA4* Y *GATA6* KNOCKOUT CONDICIONALES.

Los ratones *knockout* condicionales para *Gata4* se obtienen tras el cruce de dos generaciones. En la primera generación se obtienen ratones *Gata4*<sup>flox/+</sup>; *Pdx1-Cre* del cruce de ratones *Gata4*<sup>flox/flox</sup> con ratones *Pdx1-Cre*. En la segunda generación se cruzan ratones *Gata4*<sup>flox/+</sup> *Pdx1-Cre* con ratones *Gata4*<sup>flox/flox</sup> para obtener ratones con el genotipo *knockout* *Gata4*<sup>flox/flox</sup>; *Pdx1-Cre*. Una estrategia idéntica se usó para la generación de ratones *Gata6*<sup>flox/flox</sup>; *Pdx1-Cre*. A continuación se muestra una representación del locus de los genes *Gata4* y *Gata6* con la localización en cada caso de las secuencias *LoxP* (Fig. 2). Los ratones *Gata4*<sup>flox/flox</sup>; *Pdx1-Cre* tienen escindidos su exones 3, 4 y 5. Los ratones *Gata6*<sup>flox/flox</sup>; *Pdx1-Cre* tienen escindidos el exón 2. La escisión de secuencias codificantes en los ratones *Gata4*<sup>flox/flox</sup>; *Pdx1-Cre* o *Gata6*<sup>flox/flox</sup>; *Pdx1-Cre* resulta en proteínas GATA4 o GATA6 no funcionales.



**Figura 2. Representaciones esquemáticas de los locos de los genes *Gata4* y *Gata6* de ratón, con la localización de las secuencias *LoxP* en ratones floxeados.** Las cajas numeradas representan los exones del gen. Abajo, representación del locus *Gata4* y *Gata6* en ratones *knockout* condicionales

## **2 LÍNEAS CELULARES**

### **2.1. mPAC**

La línea celular mPAC procede de la immortalización de células de islotes pancreáticos murinos adultos (Yoshida, 1994). Estas células fueron crecidas en medio completo (DMEM con 4,5 g/L de glucosa, 41966 Gibco; Penicilina/Estreptomicina, 15140 Gibco; Glutamina 2 mM, 25030 Gibco; 10% Suero Fetal Bovino, FBS F7524, Sigma) y cultivadas en placas de 10 cm<sup>2</sup> (150350, NUNC) en un incubador a 37° C al 5% CO<sub>2</sub>. Al llegar a una confluencia del 90%, las células se subcultivaron lavándolas con PBS e incubándolas con 3 mL de tripsina-EDTA al 0,25% (25200, Gibco) durante 5 minutos a 37° C. La tripsina se neutralizó con 7 mL de medio completo y las células despegadas de la placa de cultivo se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos. El *pellet* se resuspendió en medio completo y distintas diluciones de células se subcultivaron en nuevas placas.

Para el almacenaje y congelación de las células mPAC, las células obtenidas de placas tripsinizadas, lavadas y resuspendidas en FBS, fueron contadas en la cámara de Neubauer. A continuación, en crioviales se depositaron 3·10<sup>6</sup> células en FBS con 10% DMSO (D4540, Sigma). Las células se congelaron a -80° C en una cámara con isopropanol. Para su almacenamiento, se conservaron en un tanque de nitrógeno líquido.

## **3 MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS**

### **3.1. EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO PARA EL GENOTIPADO DE RATONES**

El ADN para el genotipado de los ratones se extrajo de tejido de cola de ratón, o de muestras de saco embrionario y amnios en el caso de embriones. Siguiendo el protocolo descrito en (Dodou et al., 2003), los tejidos de cola de ratón o de sacos embrionarios se digirieron en tampón de lisis (100 mM NaCl, 25 mM EDTA, 1% SDS, 10 mM Tris-Cl, 200 mg/mL proteinasa K, pH 8.0) incubándolos a 56° C durante 16 horas. Los tejidos digeridos se trataron con una solución de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y etanol para purificar y precipitar el ADN según el protocolo:

- 1º- Añadir 500 µL de Fenol:Cloroformo:Alcohol Isoamílico (25:24:1) (K169, Amresco) y vortear.
- 2º- Centrifugar a 4° C y máxima velocidad durante 10 minutos.
- 3º- Recoger la fase superior (acuosa) y añadirle 500 mL de Etanol a 4° C.
- 4º- Incubar 5-10 minutos a -20° C.
- 5º- Centrifugar a 4° C y máxima velocidad durante 10 minutos. Eliminar el sobrenadante.
- 6º- Resuspender el *pellet* en 50-100 µL de agua destilada.

### 3.2. TÉCNICAS DE GENOTIPADO DE RATÓN

La presencia de los distintos transgenes a partir del ADN genómico de los ratones se determinaron usando las técnicas de genotipado que se especifican a continuación:

<i>Rosa26R – LacZ</i>	PCR
<i>Pdx1 – LacZ</i>	<i>Southern blot</i>
<i>Gata4<sup>flox/flox</sup></i>	PCR
<i>Gata6<sup>flox/flox</sup></i>	PCR
<i>Pdx1 – Cre</i>	PCR/ <i>Southern blot</i>

#### 3.2.1. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Para el genotipado de ciertas líneas de ratón especificadas anteriormente se usó la técnica de PCR. La PCR es un método de obtención *in vitro* de un número elevado de copias de un fragmento de ADN de interés, empleando una enzima ADN polimerasa termoestable. Como molde para esta reacción se usó el ADN genómico obtenido por la digestión y extracción de tejido de ratón descrito en el apartado 2.1.

Para la reacción de PCR se utilizó la enzima comercial *GoTaq DNA polimerase* (#9PIM300, Promega) según el siguiente protocolo:

Componente	Concentración final
5X Green GoTaq Reaction Buffer	1X
dNTPs (2 mM) (Bioline, BIO-39025)	0,2 mM
Oligonucleótido directo (25 ng / $\mu$ L)	1,25 ng / $\mu$ L
Oligonucleótido reverso (25 ng / $\mu$ L)	1,25 ng / $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,25 mM
GoTaq DNA Polymerase (5 U / $\mu$ L)	1,2 U
ADN	250-500 ng
H <sub>2</sub> O	hasta 20 $\mu$ L

En el caso de la PCR para la determinación de los alelos Rosa26R – *LacZ*, la mezcla incluía un tercer oligonucleótido a la misma concentración.

El programa de reacción estándar que se empleó fue el siguiente:

Paso	T <sup>a</sup> (°C)	Tiempo	Nota
1	95	4 min	-
2	95	45 seg	-
3	58	45 seg	-
4	72	45 seg	-
5	-	-	Repetir pasos 2-4, 35 ciclos
6	72	5 min	-
7	25	$\infty$	-

En el caso de la PCR para genotipar los ratones *Gata4*<sup>flox/flox</sup> el programa de termociclador presentaba esta modificación:

Paso	Tª (°C)	Tiempo	Nota
1	94	2 min	-
2	94	20 seg	-
3	65	15 seg	↓1,5 °C por ciclo
4	68	10 seg	-
5	-	-	Repetir pasos 2-4, 10 ciclos
6	94	15 seg	-
7	50	15 seg	-
8	72	10 seg	-
9	-	-	Repetir pasos 6-8, 28 ciclos
10	72	2 min	-
11	10	∞	-

Los oligonucleótidos (Sigma-Aldrich) utilizados para el genotipado de las distintas líneas de ratón y la longitud del fragmento amplificado se describen en la siguiente tabla:

Línea	Oligonucleótidos (5' - 3')	Tamaño de banda
<i>Pdx1</i> – Cre	F: ACGACCAAGTGACAGC R: CCAGGTTACGGATATAGTTCATG	Alelo mut = 700 pb
<i>Rosa26R</i> – LacZ	F mut: GCGAAGAGTTTGTCTCAACC F wt: GGAGCGGGAGAAATGGATATG R: AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT	Alelo mut = 340 pb Alelo silvestre = 650 pb
<i>Gata4</i> <sup>flox/flox</sup>	F: CCCAGTAAAGAAGTCAGCACAAAGGAAAC R: AGACTATTGATCCCGGAGTGAACATT	Alelo mut = 455 pb Alelo wt = 355 pb
<i>Gata6</i> <sup>flox/flox</sup>	F: GTGGTTGTAAGGCGGTTTGT R: ACGCGAGCTCCAGAAAAAGT	Alelo mut = 250 pb Alelo wt = 159 pb

Los productos de PCR se resolvieron en geles de agarosa al 2% en TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, 2 mM EDTA, pH 7,7) y se separaron por electroforesis al aplicar una diferencia de potencial de 100 V durante 20-30 minutos. Las bandas de ADN se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta (Universal Hood II, BIORAD). por la intercalación de bromuro de etidio (E8751, Sigma-Aldrich) a una concentración

final de 0,2 mg/mL. En todos los casos se utilizó un marcador de peso molecular como referencia (SM1283, Fermentas; GTP-BM0002, Gtpbio).

### 3.2.2. SOUTHERN BLOT

Para la determinar la presencia/ausencia de los transgenes *LacZ* y *Cre* en las camadas descendientes de cruces de estas líneas (*Pdx1-LacZ*; *Pdx1-Cre*) se recurrió a la técnica de hibridación de sondas de ADN, también conocida como *Southern blot*.

La extracción de ADN genómico de los ratones, adultos o embriones, se llevó a cabo según se explica en el apartado 2.1 de estos materiales y métodos.

La estrategia seguida para desarrollar la técnica de *Southern blot* para cada transgén han sido previamente optimizada en el laboratorio del Dr. Brian Black, según se indica a continuación. El ADN genómico se digirió con las siguientes endonucleasas de restricción: Eco32I (EcoRV, #R0301, Thermo) para el transgén *Cre* y SacI (#ER1131, Thermo) para el transgén *LacZ*.

Componente	Concentración final
ADN	2-25 µg
BSA (100 mg/mL)	1 mg/mL
Espermidina (100 mM)	1 mM
Buffer de restricción 10X	1X
Enzima de restricción (20 U/µL)	60 U
H2O	hasta 30 µL

La electroforesis en gel de agarosa al 0,8% en 0,5X TBE (Tris-base 45 mM, Ácido bórico 45 mM, EDTA 1 mM) separó los fragmentos de ADN resultantes de la digestión.

Para la preparación del ensayo de *Southern blot*, las moléculas de ADN genómico digeridas presentes en el gel de agarosa se hidrolizaron y desnaturalizaron en una solución ácida 0,25 M de HCl 15 minutos y se neutralizaron 15 minutos en 0,5 M de NaOH. El ADN monocatenario resultante se transfirió a una membrana de nylon

(Amersham Hybond-XL, GE Healthcare) aplicando el vacío durante 90 minutos con una bomba de vacío Vacu-Blot (Bio Pointe).

Las sondas con las secuencias de *Cre* y *LacZ* se obtuvieron mediante la digestión de plásmidos que contenían secuencias de ADN codificantes. Así, la digestión del plásmido pBS-Cre con NcoI/BamHI liberaba un fragmento de 387 pb del locus del gen *Cre*. El plásmido pCR2.1-*LacZ* digerido con EcoRI liberaba un fragmento de 350 pb del ADNc de *LacZ*.

Estas sondas se marcaron con [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP (Perkin Elmer) siguiendo el protocolo del *Random Primers DNA Labeling System* (Invitrogen). La sonda marcada purificó en una columna de Sephadex G<sub>50</sub> TE (S5897, Sigma) para eliminar el exceso de [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP no incorporado.

Tras desnaturalizar la sonda a 95°C durante 5 minutos y preparar la membrana en la solución de hibridación (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 250 mM, SDS 7%, EDTA 1 mM, pH=7,2) se incubaron ambas en un horno de hibridación durante toda la noche a 65°C en agitación. A la mañana siguiente, tras dos lavados de 15 minutos con buffer de lavado (SSPE 0,1X, EDTA 5 mM, SDS 0,5%, pH=8), se expuso una película para autoradiografía (Kodak X-Omat LS film, Sigma) a la señal de la membrana hibridada con la sonda radiactiva durante toda la noche a -80°C. A las 24h se reveló la película en un revelador automático.

### **3.3. EXTRACCIÓN DE ADN PLASMÍDICO**

La obtención de ADN plasmídico se realizó por lisis y extracción de bacterias competentes de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . Estas bacterias competentes (generadas en el Servicio de Organismos Modelo, CABIMER) se transformaron con el plásmido de interés y se incubaron en hielo durante media hora. Tras someter la muestra a un choque térmico de 42°C durante 90 segundos, se volvió a incubar en hielo durante 5 minutos. A continuación se añadió 1 mL de medio LB líquido (L2897, Sigma-Aldrich) y se incubó a 37°C durante una hora en agitación. Tras este periodo de incubación, las bacterias fueron sembradas en placas de LB agar (L3022, Sigma-Aldrich)



(suplementado con el antibiótico de selección, generalmente Ampicilina o Kanamicina) y se incubaron durante toda la noche a 37°C en una estufa.

Al día siguiente, se seleccionaron colonias individuales y se inocularon en 2 mL de medio LB con antibiótico de selección. Al cabo de 6 horas de crecimiento a 37°C en agitación, se inoculó en 100 mL de medio LB con antibiótico.

Las preparaciones de ADN plasmídico de *E. coli* DH5α se realizaron siguiendo dos procedimientos distintos, en función de sus aplicaciones posteriores.

En el caso de necesitar ADN de alta pureza para ser usado en transfecciones transitorias en líneas celulares se usó el *Plasmid Plus Midi Kit* (12943, Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para el resto de aplicaciones se usó el protocolo simplificado de lisis alcalina. El sedimento de células procedente de 2 mL de un cultivo saturado en LB se resuspendió en 100 µL de solución I (glucosa 50 mM, EDTA 10 mM, Tris HCl 25 mM, pH=8) y se incubó 5 min en hielo. A continuación se añadieron 200 µL de solución II (NaOH 0,2 N, SDS 1%) recién preparada, mezclando por inversión e incubando 5 minutos en hielo. Luego se añadieron 150 µL de solución III (NaCH<sub>2</sub>COOH 3 M, pH=4,8) se mezcló por inversión, y se incubó otros 5 minutos en hielo. Los restos celulares se eliminaron por sedimentación, centrifugando durante 10 minutos a 13.000 G y el ADN presente en el sobrenadante se precipitó añadiendo 1 volumen de etanol 96% a -20°C, y centrifugando inmediatamente durante 10 minutos a 13.000 G. El ADN precipitado se lavó con 1 mL de etanol 70% frío y se centrifugó 2 minutos a 13.000 G. El precipitado limpio se resuspendió en agua destilada. Las preparaciones de plásmidos se almacenaron a -20°C.

### **3.4. EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL**

Para evitar la degradación del ARN en las muestras por acción de las ribonucleasas, durante todo el procedimiento de extracción se utilizó material estéril y se trató la superficie y el material de trabajo con RNaseZap (AM9780, Life Technology).

En el presente trabajo se ha utilizado ARN extraído de dos fuentes distintas: páncreas embrionarios de embrión de ratones de e13.5 y páncreas de ratones adultos. Dependiendo del tamaño de la muestra de partida se emplearon dos técnicas diferentes, ambas basadas en la combinación de dos tecnologías: la lisis con guanidina-isotiocianato y la purificación en membranas de sílice.

En el caso de extracción de ARN pancreático a partir de embriones de ratón de e13.5, dado su tamaño pequeño (menos de 5 mg por tejido), se agruparon páncreas diseccionados procedentes de tres embriones con el mismo genotipo. Tras la disección individual de cada páncreas, éstos fueron conservados a -80°C en 200 µL de Buffer RLT (Qiagen) suplementado con 2-mercaptoetanol (M6250, Sigma-Aldrich) hasta identificar su genotipo. Una vez determinado su genotipo, se agruparon y homogeneizaron, pasando el tejido a través de una aguja de 20 G. Se extrajo el ARN mediante el *RNeasy Plus micro kit* (74034; Qiagen) según el protocolo proporcionado por el fabricante.

En el caso de muestras de páncreas adultos, debido a la extrema dificultad para la extracción de ARN de calidad por la liberación de ribonucleasas por parte de las células acinares del páncreas, la extracción se llevó a cabo en unas condiciones especialmente estrictas de limpieza, bajas temperaturas y rapidez. Una porción de unos 20 mg del páncreas ventral se sumergió en 500 µL de Trizol (AM9738, Ambion) y directamente se procedió a la extracción. A continuación se añadieron 200 µL de cloroformo (C2432, Sigma-Aldrich) y se centrifugó en frío durante 10 minutos a 13.000 g. La fase superior acuosa se extrajo cuidadosamente y se le añadió un volumen de Etanol 70%. Esta mezcla se cargó directamente en una columna del *RNeasy Plus mini kit* (74134, Qiagen), se incubó 20 minutos a 37°C con TurboDNase (AM2238, Life Technology) y el ARN se lavó y eluyó siguiendo las indicaciones del fabricante.

Por último, se cuantificó el ARN extraído midiendo la densidad óptica (DO) a 260 nm usando Nanodrop (NanoDrop 2000, Thermo). El análisis de calidad del ARN se

comprobó, según el caso, con mediante *Bioanalyzer* (Bioanalyzer Agilent 2100) (Servicio de Genómica, CABIMER). Las muestras fueron conservadas a -80°C hasta su utilización.

## **4 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO, CLONAJE Y MUTAGÉNESIS**

### **4.1. BLAST Y VISTA**

Los análisis de secuencias de ADN reguladoras de los genes estudiados (*Gata4*, *Gata6*, *Pdx1*, *Ptf1a*) se llevaron a cabo usando las herramientas *online* BLAST (National Library of Medicine, National Institutes of Health) y *Vista Tools* (Frazer KA, 2004).

Para identificar posibles regiones reguladoras, se realizó un análisis comparativo entre secuencias de cada gen de *Homo sapiens* (Feb. 2009) y de *Mus musculus* (Jul. 2007). Se seleccionaron regiones conservadas en ambas especies, cuya longitud fuese de, al menos, 100 pb y tuviesen una homología en nucleótidos mayor al 50%. Dentro de estas regiones se buscaron sitios de unión para GATA (WGATAR) que estuviesen perfectamente conservados.

### **4.2. CLONAJE Y MUTAGÉNESIS**

Las distintas construcciones de ADN usadas a lo largo de esta tesis se generaron usando técnicas básicas de biología molecular mediante restricción, purificación y ligación con enzimas endonucleasas y T4 ligasa. Las mutaciones puntuales fueron introducidas mediante técnicas de PCR. A continuación se detallan las estrategias usadas para cada construcción.

#### **4.2.1. *PDX1-WT-LACZ***

Para la generación del transgén *Pdx1-wt-LacZ* se clonó un fragmento *SpeI/EcoRV* de 4660 pb, que contenía 40 pb aguas abajo del inicio de la transcripción y 4620 pb aguas arriba, en el plásmido reportero AUG-β gal (McFadden et al., 2000), usando las enzimas de restricción *SpeI/SmaI*.

Como se mencionó anteriormente, para la inyección en ovocitos fecundados en la generación de transgénicos, el fragmento *Pdx1* fusionado al gen *LacZ* fue digerido del resto del vector mediante digestión con *SpeI/HindIII* previo a su purificación en gel de agarosa.

#### **4.2.2. *PDX1-MUT-LACZ***

Para la generación de la construcción *Pdx1-mut-LacZ* se usaron las mismas secuencias que en la construcción *Pdx1-wt-LacZ* pero se mutaron dos sitios GATA conservados llamados G1 y G2. La introducción de las mutaciones se realizó mediante la mutagénesis dirigida por PCR usando los mismos oligonucleótidos GATA4 mutados que se usaron en los experimentos de unión *in vitro* o *Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMSA*. Las mutaciones se comprobaron mediante secuenciación. El fragmento se purificó y preparó de forma similar a la descrita en el apartado anterior para su inyección en ovocitos fecundados.

## **5 OBTENCIÓN, PROCESAMIENTO Y MONTAJE DE TEJIDOS**

En todos los casos, el sacrificio de los ratones para la obtención de tejidos se realizó mediante dislocación cervical o el uso de una cámara de CO<sub>2</sub>, siguiendo la reglamentación del Comité de Ética del CABIMER.

### **5.1. OBTENCIÓN DE TEJIDOS EMBRIONARIOS A DISTINTOS ESTADIOS DE GESTACIÓN**

Para la obtención de embriones a distintos estadios de la gestación se establecieron los cruces pertinentes y las hembras fueron revisadas diariamente para la detección del tapón vaginal. El día de aparición de un tapón vaginal fue considerado como día 0,5 de gestación (e0.5). Las hembras gestantes se sacrificaron a los distintos estadios de interés por dislocación cervical y se extrajeron los embriones, se retiró la placenta, se reservó el saco embrionario para extraer ADN necesario para el genotipado de cada uno de los embriones y se retiró el amnios. Los embriones de estadios comprendidos entre e9.5 y e11.5 fueron fijados y procesados para su histología e

inmunohistoquímica de forma íntegra. En estadios a partir de e11.5, los embriones fueron diseccionados para obtener los órganos objeto de estudio.

## **5.2. OBTENCIÓN DE TEJIDO PANCREÁTICO DE RATONES ADULTOS**

Para las técnicas de histología e inmunohistoquímica con páncreas adultos, éstos se obtuvieron tras el sacrificio del animal por dislocación cervical. Inmediatamente tras el sacrificio, se abrió la cavidad abdominal del animal y se le extrajo el tejido pancreático. A continuación, el páncreas se lavó varias veces con PBS frío y con la ayuda de una lupa estereoscópica se eliminaron los restos de tejidos adyacentes.

## **5.3. FIJACIÓN, CAPTURA DE IMÁGENES, PROCESAMIENTO Y MONTAJE DE TEJIDOS**

Todos los tejidos adultos o embrionarios se lavaron en tampón PBS y se fijaron en una solución de paraformaldehído al 4% (PFA 4%; P6148-500G, Sigma-Aldrich) en PBS durante toda la noche a 4°C. El volumen de PFA al 4% fue de al menos cinco veces el volumen del tejido a fijar. En el caso de páncreas adultos, la fijación se realizó en movimientos de rotación en una noria.

Tras la fijación, los tejidos se lavaron con PBS para eliminar los restos de PFA y se conservaron a 4°C en una solución de azida sódica en PBS al 0,01% (10369-2k, AnalaR NORMAPURE). Los órganos fijados se analizaron bajo una lupa (MZ16, Leica) y fueron fotografiados con una cámara acoplada a la lupa (DFC 500).

Una vez fijados y fotografiados, los tejidos se trataron para incluirlos en parafina a través de un proceso de deshidratación por medio de una serie de concentraciones crecientes de etanol y de pasos por xileno (28975.360, AnalaR NORMAPURE) y por parafina (1116092504, Merck-Millipore). Para ello se utilizó el procesador de tejidos automático Leica TP 1020, y se usó el siguiente programa:

Cubeta	Tiempo
PBS	10 min.
Etanol 70%	30 min.
Etanol 80%	30 min.
Etanol 96%	30 min.
Etanol I	40 min.
Etanol II	40 min.
Xileno I	40 min.
Xileno II	40 min.
Parafina I	70 min.
Parafina II	70 min.

Una vez deshidratados, los tejidos fueron incluidos en bloques de parafina en una estación de inclusión en parafina (Leica EG 1150 H) y los bloques se conservaron a 4°C hasta su utilización posterior.

#### 5.4. CORTE DE TEJIDOS EN MICROTOMO

Los bloques de parafina se cortaron en secciones de 6 µm en un microtomo Leica DM6000B. Se usaron portaobjetos Superfrost Plus (631-0108, VWR). Para las técnicas de tinciones histológicas y técnicas de inmunohistoquímica, los cortes en parafina se rehidrataron sumergiéndolos en una batería con xileno, para eliminar el exceso de parafina, y etanol diluido en agua en concentraciones decrecientes, para rehidratarlos:

Cubeta	Tiempo
Xileno I	3 min
Xileno II	3 min
Etanol I	2 min
Etanol II	2 min
Etanol 90%	2 min
Etanol 70%	1 min
H <sub>2</sub> O	5 min

## 6 HISTOLOGÍA

### 6.1. TINCIÓN CON X-GAL

Para la detección de la expresión del gen *LacZ* en los ratones reporteros (ratones *Pdx1-Cre; Rosa26R-LacZ* y *Pdx1-LacZ*) se realizó un ensayo colorimétrico de la enzima  $\beta$ -galactosidasa, codificada en el gen *LacZ*, mediante la tinción con X-gal. Las células que expresan la enzima  $\beta$ -galactosidasa, son capaces de hidrolizar el sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -galactopiranosido (X-gal) a galactosa y 5-bromo-4-cloro-3-hidroxiindol, que cuando se oxida a 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo adquiere un color azul intenso.

Para la tinción con X-gal, los tejidos se fijaron en una solución de 2% de paraformaldehído (P6148-500G, Sigma-Aldrich) y 0,2% de glutaraldehído (G5882, Sigma-Aldrich) en PBS a pH=7,4. Dependiendo del tamaño y origen del tejido, los tiempos de fijación varían. En la siguiente tabla se especifican los tiempos de fijación para cada tipo de muestra:

Estadio embrionario (e)	Tiempo de fijación
e8.5 – e9.5	30 minutos
e10.5 – e11.5	60 minutos
e12.5	1,5 horas
e13.5	2 horas
e14.5	2,5 horas
e15.5	3 horas
e16.5 - e17.5	4 horas
Adultos	5 horas

Una vez fijados, los tejidos se lavaron con PBS y se sumergieron en solución de tinción durante toda la noche en oscuridad a temperatura ambiente. En el caso de tejidos adultos, el tejido se mantuvo en agitación para lograr que el reactivo se introdujese en el interior del órgano.

La solución de tinción se obtiene disolviendo 825 mg de ferricianida de potasio y 920 mg de ferrocianida de potasio en 500 mL de agua destilada. 15 minutos antes de su

uso, se añadieron 10 µL/mL de una solución de X-gal (B4252, Sigma Aldrich) a una concentración de 100 mg/mL en disuelto en dimetilformamida. Los tejidos incubados con X-gal se mantuvieron 12 horas en oscuridad a temperatura ambiente.

Al día siguiente, los tejidos se lavaron con PBS y se procesaron, se incluyeron en parafina, se montaron y se cortaron en microtomo tal y como se explicó en el apartado anterior. Para la detección de los núcleos en los cortes histológicos teñidos con X-gal se usó una solución de *Nuclear Fast Red* (N3020-100ML, Sigma-Aldrich), siguiendo el procedimiento previamente descrito (Anderson et al., 2004)

### 6.2. TINCIÓN CON HEMATOXILINA Y EOSINA (H&E)

Los cortes de tejidos desparafinados y rehidratados fueron teñidos con hematoxilina y eosina siguiendo el protocolo abajo indicado. Cabe destacar la importancia de usar agua del grifo en vez de agua destilada, especialmente en el paso previo a la tinción con hematoxilina. En cubetas de vidrio, se dispusieron hematoxilina de Gill III (1.05174.0500, Merk), alcohol ácido (1% HCl, 29% H<sub>2</sub>O, 70% etanol) y eosina Y acuosa al 1% (05-10002/L, Bio-Optica). Los tiempos de tinción variaron en el caso de tejido embrionario o páncreas adultos

Paso	Tejido embrionario	Tejido adulto
Hematoxilina	2,5 min	4 min
H <sub>2</sub> O del grifo	Lavar debajo del grifo	Lavar debajo del grifo
Alcohol ácido 1%	5 segundos (7-10 golpes)	5 segundos
H <sub>2</sub> O del grifo	Lavar en la cubeta	Lavar en la cubeta
Eosina	2 min	1,5 min
H <sub>2</sub> O del grifo	Lavar debajo del grifo	Lavar debajo del grifo

Una vez finalizada la tinción, los cortes histológicos se deshidrataron pasándolos por cubetas con una serie de alcoholes diluidos en agua y terminando en dos cubetas con xileno (etanol 70%, etanol 90%, etanol 100% I, etanol 100% II, xileno I y xileno II). Cada pase por las distintas cubetas fue de un minuto de duración. Después del



último pase en xileno, las muestras se montaron con cubreobjetos añadiéndole medio de montaje para microscopia DPX (360294H, VWR BDH Prolabo).

### 6.3. TINCIÓN TRICRÓMICA DE GOMORI

Los cortes histológicos desparafinados se trataron como en el protocolo anterior. En tres cubetas histológicas se dispusieron las soluciones durante los tiempos que se especifican a continuación:

Paso	Tiempo
Hematoxilina	5 minutos
H <sub>2</sub> O del grifo	Lavar debajo del grifo
Tricrómico de Gomori	10 minutos
Ácido acético 0,2%	5 segundos

Tras este último paso, los cortes se deshidrataron en soluciones de etanol 95%, etanol 100% y xileno, como en el protocolo anterior.

## 7 TÉCNICAS DE INMUNOHISTOQUÍMICA/INMUNOFLUORESCENCIA

### 7.1. INMUNOHISTOQUÍMICA/INMUNOFLUORESCENCIA

Para la inmunodetección de la expresión de distintos antígenos en las secciones de parafina, se llevaron a cabo técnicas de inmunohistoquímica. Los cortes histológicos fueron desparafinados y rehidratados como se explica en el apartado 5.4. A continuación, se procedió al desenmascaramiento de los epítomos sumergiendo los portaobjetos con las muestras en tampón citrato 10 mM pH=6 a 121°C durante 40 minutos. Para ello, se utilizó un autoclave de sobremesa Selecta de 7 litros (4001745, Selecta). Después del autoclave y dejar enfriar los tejidos, se lavaron con agua y PBS y se procedió a la inmunodetección de antígenos mediante técnicas de inmunofluorescencia (IF), en los que el anticuerpo secundario estaba unido a un fluoróforo, o bien técnicas de inmunohistoquímica (IHC) en los que el anticuerpo secundario está acoplado a una enzima, generalmente la peroxidasa del rábano (HRP, del inglés *horseradish peroxidase*). La peroxidasa, al entrar en contacto con el

reactivo, genera un complejo no soluble en el lugar donde se encuentra el complejo sustrato-anticuerpo-enzima. En el caso de inmunodetección mediante HRP, los tejidos se trataron con una solución al 5% de  $H_2O_2$  durante 15 minutos a temperatura ambiente para inactivar la peroxidasa endógena, particularmente abundante en el tejido pancreático.

Tanto para IF como para IHC y previo a la incubación con el anticuerpo primario, los tejidos fueron lavados en agua y PBS y e incubados durante una hora en una cámara húmeda con solución de bloqueo (3% suero fetal bovino en PBS-T 0,2%) a temperatura ambiente. Para evitar la desecación del tejido durante el bloqueo de los epítomos inespecíficos, se colocaron tiras de film de parafina (Parafilm M, P7793 Sigma) sobre los cortes, con cuidado de no dañar el tejido. Tras un breve lavado en PBS, se añadieron los anticuerpos primarios diluidos según se indica en la tabla siguiente en una solución al 1,5% de suero fetal bovino en PBST 0,2% durante toda la noche a 4°C en la cámara húmeda. Para conseguir una distribución homogénea del anticuerpo por toda la muestra, se usaron cámaras de incubación. Los anticuerpos usados y sus correspondientes diluciones están recogidos en una tabla al final de este apartado.

Para las tinciones por IF, se lavaron los tejidos con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente diluido 1/300 en una solución al 1,5% de suero fetal bovino en PBS-T 0,2%. Se emplearon los anticuerpos secundarios conjugados con fluoróforos Alexa-488 o Alexa-568 (Invitrogen). Tras la incubación, se lavaron los tejidos con PBS para limpiar el exceso de anticuerpo secundario. Para revelar los núcleos, la muestra se tiñó con DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole - 32670; Sigma Aldrich) 5 ng/mL en PBS durante 5 minutos. Los tejidos se montaron con un medio de montaje para fluorescencia (S3023, Sigma-Aldrich).

Para las tinciones por IHC se emplearon anticuerpos secundarios diluidos 1/300 en una solución al 1,5% de suero fetal bovino en PBS-T 0,2% que reaccionaban contra el anticuerpo primario y que iban conjugados con biotina (Termo Scientific). Tras una incubación de una hora a temperatura ambiente y lavar con PBS, se prosiguió según

los protocolos generales de los kits comerciales *Vectastain Elite ABC* (PK-6100, Vector Laboratories) y *DAB Substrate* (3, 3'-diaminobenzidine - SK-4100, Vector Lab). Por último, se deshidrataron los tejidos mediante lavados en concentraciones crecientes de etanol y xileno y se montaron con medio DPX (360294H, VWR BDH Prolabo).

Tras el montaje de las secciones, éstas fueron fotografiadas con la cámara DFC 500 para luz blanca o DFC 390 FX para fluorescencia, ambas acopladas a un microscopio Leica AF 6000, en el servicio de microscopía del CABIMER.

## 7.2. LISTA DE ANTICUERPOS:

fuelle	anticuerpo	dilución	compañía
mouse	anti-amylase	1:200	Santa Cruz Biotechnology, Sc-46657
rabbit	anti-carboxypeptidase 1	1:800	AbD Serotec, 1810-0006
rabbit	anti-cleaved caspase-3	1:200	Cell Signaling, Massachusetts, USA; 9661
rat	anti-cytokeratin 19	1:200	(DSHB) TROMA III; developed by Ralf Kemler, Max-Planck Institute, Germany
mouse	anti-E-cadherin	1:100	BD Bioscience 610186
mouse	anti-GATA4	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Sc-25310
rabbit	anti-GATA6	1:50	Santa Cruz Biotechnology, Sc-9055
rabbit	anti-glucagon	1:200	Cell signaling, 2760
rabbit	anti-GLUT2	1:400	Millipore, 07-1402
mouse	anti-insulin	1:500	Sigma, I2018
rabbit	anti-Ki67	1:100	Thermo, RM-9106-S
hamster	anti-mucin	1:300	Thermo Scientific, HM-1630
mouse	anti-Ngn3	1:200	(DSHB), F25A1B3; developed by Ole D. Madsen, Hagedorn Research Institute, Denmark
mouse	anti-Nkx2.2	1:25	(DSHB), 74.5A5, developed by Thomas M. Jessell and Susan Brenner-Morton, Columbia University, USA
mouse	anti-Nkx6.1	1:50	(DSHB), F55A10, developed by Ole D. Madsen, Hagedorn Research Institute, Denmark
guinea pig	anti-Pdx1	1:200	Abcam, ab47308
rabbit	anti-Phospho-Histone H3	1:500	Millipore, Billerica, MA, USA; 06-570
rabbit	anti-Ptf1a	1:2000	Beta Cell Biology Consortium, AB2153
mouse	anti-smooth muscle $\alpha$ -actin	1:300	Sigma-Aldrich, A5228
rabbit	anti-Sox9	1:800	Millipore, AB5535
rabbit	anti- $\beta$ -galactosidase	1:500	MP Biochemicals, 559762
-	biotinylated DBA	1:300	Vector Laboratories, B.1035

## **8 CUANTIFICACIONES**

### **8.1. CUANTIFICACIÓN DEL ÁREA ACINAR**

Para cuantificar el área de tejido acinar se realizaron tinciones por inmunofluorescencia usando un anticuerpo para amilasa en secciones de páncreas de ratones adultos. Se hicieron tinciones en 3 ratones de cada grupo y se realizaron 3 secciones separadas entre sí por 100  $\mu\text{m}$  de grosor de cada ratón. De cada una de las secciones se tomaron 3 imágenes con una magnificación 200X. Se separó cada una de las imágenes tomadas en el microscopio de fluorescencia en canales RGB y se procesaron mediante el software Metamorph (*MetaMorph Basic Offline Software*). Los umbrales de medición fueron especificados para cada una de las imágenes individualmente tomando como referencia la imagen original de ambos canales solapados. De este modo, se evitan las diferencias en los tiempos de exposición, sensibilidad de los anticuerpos o sensibilidad de los aparatos. Se midió el área total del páncreas (teñido con el marcador nuclear DAPI) y el área de amilasa (marcado con el fluoróforo rojo) y se calculó el porcentaje de superficie productora de amilasa expresada en tanto por ciento con respecto al área total de tejido.

### **8.2. CUANTIFICACIÓN DEL ÁREA DE CÉLULAS $\beta$ PANCREÁTICAS**

Para la cuantificación de masa  $\beta$  se utilizó un marcaje con anticuerpos anti-insulina, producido específicamente por estas células pancreáticas. Se analizaron tres ratones de cada grupo experimental. Para obtener una representación significativa de todo el tejido pancreático, se analizaron y cuantificaron 10 cortes distintos de cada ratón, separados entre sí por 100  $\mu\text{m}$  de grosor. De cada corte, se captaron 64 imágenes en campos de 8 x 8 (con una superposición de las imágenes del 10%) tomadas con un objetivo 40X. Para medir el área total del páncreas se utilizó la tinción con DAPI. Mediante el programa *Metamorph Image Analysis System v.7.1.* se calculó el porcentaje de masa  $\beta$  (área de insulina positiva) expresada en tanto por ciento con respecto al área total de tejido (área teñida con DAPI).

### **8.3. CUANTIFICACIÓN DE CÉLULAS PROLIFERATIVAS**

Para cuantificar las células proliferativas del tejido pancreático se realizaron dobles tinciones inmunológicas con anticuerpos para marcadores de proliferación (anti-Ki67 o anti-PHH3) y para marcador epitelial (E-cadherina). Se captaron imágenes en barrido por toda la superficie de la sección, combinando imágenes con aumento 20x que fueron superpuestas para formar una sola imagen final. Se cuantificaron un total de tres secciones completas de cada uno de los ratones y se cuantificaron un total de tres ratones en cada grupo experimental.

Mediante el programa de análisis de imágenes *Metamorph Image Analysis System v.7.1*, se cuantificó y se obtuvo el porcentaje de células proliferativas (PHH3<sup>+</sup> o Ki67<sup>+</sup>) por área de epitelio pancreático (delimitado por el área E-cadherina positiva).

#### **8.4. CUANTIFICACIÓN DE CÉLULAS APOPTÓTICAS**

Para la cuantificación de células apoptóticas se usó como marcador la forma activada de la Caspasa 3, y la E-cadherina para delimitar el área del epitelio pancreático. De forma similar al método usado en la cuantificación células proliferativas en el apartado anterior, con el programa de análisis de imágenes *Metamorph Image Analysis System v.7.1*, se cuantificó y se obtuvo el porcentaje células apoptóticas por área de epitelio pancreático (marcado por la E-cadherina).

### **9 CUANTIFICACIÓN DE TRANSCRITOS DE ARNs MENSAJERO POR PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL**

#### **9.1. REACCIÓN DE LA TRANSCRIPTASA REVERSA**

A partir del ARN obtenido según se explica en el apartado 3.4 se realizó una reacción de retrotranscripción para pasar el ARN a ADN complementario (ADNc) monocatenario mediante la acción de la enzima transcriptasa reversa. Para ello se utilizó el sistema *Quantitect Reverse Transcription Kit* (205311, Qiagen), que incluye todos los componentes necesarios para el proceso, y se siguió el protocolo según las indicaciones del fabricante. Brevemente, se utilizó 1 µg de ARN purificado y se incubó brevemente en tampón *gDNA Wipeout* a 42°C para eliminar el ADN genómico. Tras este paso, se añadió una mezcla maestra (Quantiscript Transcriptasa

Inversa, Quantiscript RT Buffer y RT primer mix) que permitió la transcripción reversa a 42°C durante X minutos. Por último, se inactivó la reacción a 95°C. Las muestras de ADNc se almacenaron a -20°C hasta la realización de la PCR cuantitativa.

## 9.2. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA A TIEMPO REAL

El ensayo de PCR en tiempo real con las muestras de ADNc de páncreas de ratón se llevó a cabo empleando el kit *Fast Start Universal SYBR Green Master* (04913850001, ROCHE). Cada reacción de RT-PCR contenía 6 µL de SYBR 2x, 0,5 µL de cada oligonucleótido (5 µM) y 100 ng de ADNc diluidos en 5 µL de agua. La reacción fue llevada a volumen final de 12 µL. Cada una de las muestras se analizó por triplicado y los valores obtenidos de la amplificación de los genes de estudio fueron normalizados con la expresión de un gen de referencia o endógeno, la  $\beta$ -actina. Para calcular los cambios en la expresión génica se empleó el método de la  $\Delta\Delta C_t$  (Pfaffl, 2001).

Los oligonucleótidos empleados en esta tesis se muestran en la siguiente tabla:

Primer	Forward	Reverse
AFP	5'-CTTCCCTCATCCTCCTGCTAC-3'	5'-ACAAACTGGGTAAAGGTGATGG-3'
Apoa2	5'- AATGGTCGCACTGCTGGTAA-3'	5'- TTGGCCTTCTCCACCAAATC-3'
Apob	5'- TGGGATTCCATCTGCCATCTCGAG -3'	5'- GTAGAGATCCATCACAGGACAATG-3'
Apoc2	5'- ACTGGAGTGAGCCAGGATAGTCCCTT-3'	5'- CTGCCCCGAGTCATCTTCCTGGTT-3'
Apoh	5'- AGTGCACGGAGGAAGGAAAA-3'	5'-TTTCCGATCATGGCAAAGTG-3'
Fgfr2b	5'-CCCATCCTCCAAGCTGGACTG-3'	5'-CAGAGCCAGCACTTCTGCATTG-3'
Fgfr4	5'-TTGGCCCTGTTGAGCATCTTT-3'	5'-GCCCTCTTTGTACCAGTGACG-3'
Nkx2.2	5'-TCGCTCTCCCCTTTGAACCTT-3'	5'-GTTAACGTTGGGATGGTTTGG-3'
Pdx1	5'-AGCTCCCTTTCCCGTGGATGAAAT-3'	5'-TAGGCAGTACGGGTCCTCTTGT-3'
Ptf1a	5'-GCACTCTCTTTCCTGGACTGA-3'	5'-TCCACACTTTAGCTGTACGGA-3'
Sox9	5'-GCAGACCAGTACCCGCATCT-3'	5'-TTCAGCAGCCTCCAGAGCTT-3'
$\beta$ -actina	5'-TCCTGTGGCATCCACGAACTACA-3'	5'-ACCAGACAGCACTGTGTTGGCATA-3'

## 10 ELECTROMOBILITY SHIFT ASSAY (EMSA)

Los experimentos de retardo en gel en la unión proteína-ADN se llevaron a cabo basándonos en protocolos previamente descritos (Rojas et al., 2008) y que se detallan a continuación.

En primer lugar, se diseñaron las cadenas sentido y antisentido correspondientes a las secuencias a analizar y dejando tres guaninas (G) sin aparear en cada extremo 5' de cada oligonucleótido. Partiendo de una concentración de cada oligonucleótido a 1 mg/mL se mezclaron 5 µL de cada uno de ellos con 10 µL de tampón de hibridación (véase abajo la composición) y se incubó en el termociclador siguiendo el siguiente programa :95° C 10 min, 90° C 10 min, 65° C 10 min, 25° C 10 min. A continuación, los oligonucleótidos de doble cadena se marcaron con [<sup>32</sup>P]dCTP, empleando el kit *DNA Polymerase 1 Large* (Klenow Fragment) (M220A, Promega). Finalmente, las sondas se purificaron en un gel no desnaturizante de poliacrilamida (0311-500ML, Amresco) al 10% en 0,5x TBE. El fragmento de gel que contenía la sonda se incubó durante toda la noche a 37° C en 250 µL de una solución de KCl 40 mM para eluirlo de la acrilamida. Tras centrifugar la sonda durante 10 minutos, se cuantificó en un contador de centelleo líquido para radiación beta LS6500.

Las proteínas recombinantes GATA4 y GATA6 se sintetizaron a partir de la transcripción y traducción de ADNc específicos para ambos genes usando el *TNT Coupled Transcription-Translation System* (Promega) y siguiendo las indicaciones del fabricante. La proteína recombinante GATA4 se generó a partir del plásmido pCITE-GATA4, y la proteína recombinante GATA6 a partir del plásmido pCITE-GATA6. Ambos plásmidos habían sido usados y descritos con anterioridad en nuestro laboratorio y contienen el promotor de la ARN polimerasa T7 para su transcripción (Rojas et al., 2005).

Las cadenas sentido de los oligos conteniendo las secuencias GATA (indicados en negrita) identificados en el gen *Pdx1* se muestran en la siguiente tabla X )G1, G2 y G3-G4). Para comprobar la especificidad de la unión de las proteínas GATA a las

secuencias encontradas en las regiones reguladoras del gen *Pdx1* se usaron los mismos oligos indicados anteriormente con los sitios GATA mutados (G1 mut, G2 mut y G3-G4 mut)

Sitio GATA	Oligonucleótido directo
G1	5'-GGGCACTAGGTAGATTATCTGTGAGGGTCAACAC-3'
G1 mut	5'-GGCACTAGGTAGAgATCTGTGAGGGTCAACAC-3'
G2	5'-GGACTCGCGCCGAGGAGATAGCATCGAGTCCCTGGC-3'
G2 mut	5'-ACTCGCGCCGAGGAGcTaGCATCGAGTCCCTGGC-3'
G3-G4	5'-GGGTACCTCCAGTATCAGGGAGGACTATCAGGACGTCC-3'
G3-G4 mut	5'-GTACCTCCAGgATCcGGGAaGACTcTCAGGACG-3'

Para la reacción de unión in vitro se mezclaron los siguientes reactivos y en el siguiente orden:

- 5 µL de proteína recombinante
- 1 µg de poly (dI-dC)
- 1 µL de oligonucleótido competidor sin marcar radiactivamente (en el caso de experimentos de competición)
- 1 µL de Tampón de unión 10x

A continuación se incubada durante 20 minutos a temperatura ambiente

- Por último se añadió la sonda marcada radiactivamente (50.000 cuentas/reacción) y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente.

Los complejos proteína-ADN fueron resueltos en un gel de poliacrilamida al 6% en 0,5x TBE a 150 V durante 3 horas. Finalizada la electroforesis, el gel se traspasó a papel Whatman y se secó a 80° C durante 45 minutos. El gel seco se expuso se expuso durante toda la noche a -80° C con una película autorradiográfica (Kodak X-Omat LS film, Sigma y se reveló en autorrevelador.

	Tris 100 mM, pH 7,6
	DTT 10 mM
	MgCl <sub>2</sub> 20 mM
	Espermidina 2 mM
<i>Tampón de hibridación 2X</i>	



<i>Tampón de unión 10X</i>	KCl 400 mM
	HEPES 150 mM, pH 7,9
	EDTA 10 mM
	DTT 5 mM
	Glicerol 50%
<i>TBE 5X</i>	Trizma base 1,1 M
	Ácido bórico 900 mM
	EDTA 0,5 M pH 8,0

## 11 ESTUDIOS *IN VIVO*

### 11.1. TEST DE TOLERANCIA INTRAPERITONEAL A LA GLUCOSA (IGTT)

Previos a los experimentos de test de intolerancia la glucosa, los animales objetos de estudio fueron privados de comida durante al menos 12 horas. Por la mañana, se midieron los niveles de glucosa basal en ayunas. Para ello se les realizó una pequeña incisión en el extremo de la cola y se les extrajo una gota de sangre. El análisis de la glucemia se realizó con un glucómetro Accu-Check Aviva Plus con sus correspondientes tiras reactivas (05987431, Accu-Check). A continuación, los ratones fueron inyectados con 2 g de D-glucosa (G8270, Sigma-Aldrich) por cada kg de ratón, disueltos en PBS. La glucemia se midió a los 15, 30, 60 120 y 150 minutos después de la inyección.

### 11.2. ANÁLISIS DE SECRECIÓN DE INSULINA EN PLASMA

Siguiendo el protocolo indicado en la sección 11.1, a los animales en ayunas e inyectados vía intraperitoneal con glucosa (2 g/kg de peso de animal), se les extrajeron 80 µL de sangre a través de la vena caudal. La toma de muestra de sangre se les realizó a tiempo 0, 15, 30, 60 120 y 150 minutos después de la sobrecarga de

glucosa. Para la extracción de sangre se usaron capilares heparinizados (3517845001, Roche).

Una vez obtenidas todas las muestras y conservadas en hielo, se centrifugaron durante 30 minutos a 3000 g y a 4°C para separar el plasma. Para la detección de insulina plasmática se usaron 10 µL del plasma obtenido en cada punto y se midió mediante un kit Elisa de detección de insulina específico para ratones (10-1149-01, Mercodia).

### **11.3. TEST DE TOLERANCIA INTRAPERITONEAL A LA INSULINA (IITT)**

Este test está basado en el protocolo publicado previamente (Bruning et al., 1997).

Los animales fueron sometidos a ayuno durante 6 horas, al cabo de las cuales se les midió la glucosa basal. A continuación los ratones a continuación fueron inyectados intraperitonealmente con 0,75 U de insulina por kg de peso del animal. Los ratones se introdujeron de nuevo en la caja, con acceso libre al agua durante toda la prueba. Se tomaron muestras de sangre mediante una pequeña incisión en la cola y se midió la glucemia a los 15, 30, 60, 90 y 120 minutos después de la inyección,

Para la preparación de la insulina, se utilizaron alícuotas de 100 U/mL de insulina regular humana Humulin-R que se diluyeron con solución salina fisiológica estéril hasta la concentración deseada. La preparación de la muestra se hizo justo antes de la inyección en hielo.

### **11.4. MODELO DE DIABETES INDUCIDA POR ADMINISTRACIÓN DE BAJA CONCENTRACIÓN DE ESTREPTOZOTOCINA EN MÚLTIPLES DOSIS**

La diabetes inducida por estreptozotocina es un modelo ampliamente usado en el que selectivamente se destruyen las células beta pancreáticas causando hiperglucemia. Tras un ayuno de 4 horas, los ratones fueron inyectados con una dosis de 50 mg/kg de animal de estreptozotocina (STZ) (Sigma, S0130) disuelto en tampón citrato a 10 mM, a lo largo de 5 días consecutivos por vía intraperitoneal. La vida media de las STZ es de 15 minutos, por lo que la solución en el tampón citrato se preparó inmediatamente antes de su uso. El grupo de animales control se inyectó sólo con tampón citrato.

La glucemia de estos ratones se evaluó antes de la administración de la droga y después cada día para hacer un seguimiento de la función del páncreas endocrino. La glucosa fue medida usando un glucómetro Accu-Check Aviva Plus y tiras reactivas Accu-Check (05987431) a través de una gota de sangre obtenida a través de la vena caudal.

*Tampón Citrato 10 mM para la inyección de STZ:*

Ajustar a un pH=4,5 una solución de citrato de sodio dihidrato 1 M usando una solución de ácido cítrico anhidro 1 M.

Añadir 10 mL de una solución de NaCl 9% en agua (p/v) a 1 mL del buffer citrato y completar hasta un volumen final de 100 mL con H<sub>2</sub>O destilada.

Ajustar el pH final a 4,5. Esterilizar la solución a través de un filtro de 0,22 µm.

#### **11.5. MODELO DE PANCREATITIS AGUDA INDUCIDA POR CERULEÍNA**

Para inducir una pancreatitis aguda en ratones, se inyectaron intraperitonealmente con una concentración de ceruleína de 85 µg/kg de peso del animal en un volumen final de 100 µL de PBS. El grupo control de animales fue inyectados con PBS.

Se usaron ratones adultos jóvenes a las 7 semanas de vida con un peso aproximado de 25 g. Con la elección de esta edad temprana de administración se tratan de minimizar los efectos intrínsecos de la insuficiencia de GATA6 en el ratón adulto como ya había sido descrito (Martinelli et al., 2013).

Los ratones fueron tratados con 8 inyecciones al día por vía intraperitoneal durante 2 días consecutivos (una inyección cada hora) en un tratamiento de 16 inyecciones en total. (Jensen et al., 2005; Morris et al.) (Morris et al., 2010). La última inyección constituye el tiempo 0. Los ratones fueron sacrificados para analizar el tejido pancreático a las 24h, 48h, a los 7 y 21 días.

#### **11.6. ACTIVIDAD AMILASA EN SUERO**

Para determinar la actividad amilasa en ratones tratados con ceruleína suero se utilizó el *Amylase Assay Kit* (ab102523, Abcam). Para ello, se utilizó 1 µL de suero de ratones control o tratados con ceruleína extraído a los 60 minutos y a las 24 horas de

la última administración de ceruleína. El suero se extrajo a partir de sangre extraída de la vena caudal utilizando tubos *Microvette CB 300 K2E* (Sarstedt, Germany).

Las muestras de suero se conservaron en frío y se procesaron tal como indica el fabricante. Para las muestras tratadas con ceruleína, el suero se diluyó 1:50 mientras que los controles tratados con PBS se diluyeron 1:10. Se midió la actividad cinética de la amilasa durante 30 minutos utilizando un espectofotómetro para lectura en microplacas (Varioskan, Thermo).

## **12 CHROMATIN IMMUNOPRECIPITATION (CHIP)**

Para los experimentos de inmunoprecipitación de cromatina se utilizó el kit *Dynabeads Protein A* (100.01D, Invitrogen) siguiendo de manera general las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones. Para ello, se usaron células de la línea mPAC que crecieron en un medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (Yoshida, 1994). Estas células crecieron en cultivo adherente en placas de 10 cm a una densidad aproximada de  $1,5 \cdot 10^6$  células por placa. A este punto de confluencia, las células fueron tratadas con una solución al 1% de formaldehído a 37° C durante 10 minutos para fijar los complejos ADN-proteína. Estas células se sometieron a un proceso de lisis y extracción de la cromatina, que fue posteriormente sonicada mediante 5 pulsos de 10 segundos con una amplitud del 10% en un ultrasonicador Branson 15 Digital Sonifier. Los fragmentos de ADN sonicados tenían un tamaño comprendido entre las 200 y 1000 pares de bases. Estos fragmentos se incubaron con Dynabeads Protein A acopladas con 4 µg del anticuerpo de interés durante 1 hora a 4° C en rotación. Se usaron el anticuerpo de ratón anti-GATA4 (Sc-25310, Santa Cruz Biotechnology Inc.) y el anticuerpo de conejo anti-GATA6 (Sc-9055, Santa Cruz Biotechnology Inc.). Como control de inmunoprecipitación inespecífica de los anticuerpos, se empleó la misma cantidad de cromatina incubada con 4 µg de IgG anti-conejo (Sigma) o 4 µg de IgG anti-ratón acopladas a las Dynabeads. Tras la incubación, los complejos cromatina-proteína-anticuerpo-dynabeads fueron recogidos usando un imán DynaMag-2 (123.21D, Invitrogen). Tras la incubación del complejo con una solución de 200 mM de NaCl a 65° C para revertir la fijación de los complejos, los fragmentos de ADN precipitado se recuperaron mediante una extracción con fenol:cloroformo:isoamílico. Estos

fragmentos se sometieron posteriormente a una reacción de PCR usando oligonucleótidos específicos de las zonas de unión GATA en el promotor de *Pdx1*: 5'-TGACCAGGTGAAGGAAGGTCC-3' y 5'-TAATGTAGATTTGTCTCATCC-3'. Como control negativo de inmunoprecipitación, se usó un par de oligonucleótidos que amplificaban el 2 exón de la ciclina D2, previamente descrito (Rojas et al., 2008). La región 3'UTR del promotor de *Pdx1* también fue usada como negativo usando los siguientes oligonucleótidos: 5'-CTTTCTGGATGCTGCTCACAG-3', 5'-TAATGGTAGATTTGTCTCATCC-3'.

### 13 MICROARRAY

A partir de ARN total extraído de páncreas de ratón embrionario a e13.5 se realizó un estudio comparativo de expresión génica entre ratones control y ratones GATA4/GATA6 knockout mediante análisis de microarray. Tanto el análisis como el estudio estadístico de la expresión génica fue realizado en la Unidad de Genómica del CABIMER y se usó la GeneChip® Mouse Gene 2.0 ST Array de Affymetrix.

### 14 TRANSFECCIONES TRANSITORIAS

Se realizaron transfecciones para determinar la actividad luciferasa asociada a la actividad del promotor de *Pdx1* a través del vector reportero comercial pGL3 que codifica para la *Firefly luciferase*. Estas transfecciones se llevaron a cabo en células mPAC, mantenidas en medio DMEM suplementado con 10% de FBS. Para ello, estas células se cultivaron a una densidad de 80.000 células por pocillo en placas de 24 pocillos. Las células se transfectaron con Lipofectamine 2000 (Promega) siguiendo las indicaciones del fabricante. Los pocillos se transfectaron por triplicado con 500 ng de los plásmidos pGL3-basic, pGL3-*Pdx1*-WT y pGL3-*Pdx1*-mut según correspondiese (las construcciones se explican detalladamente en el apartado X de Materiales y Métodos). Para normalizar la actividad de la *firefly luciferase*, cada pocillo se co-transfectó con 5 ng del plásmido reportero pRL-renilla (Promega).

Tras 48 horas, las células se recogieron y se midió la actividad luciferasa, siguiendo las instrucciones del kit comercial *Dual Luciferase Kit Assay* (Promega). La señal se

detectó utilizando el luminómetro Glomax 20/20 (Promega). Se realizaron al menos 3 experimentos independientes por triplicado para cada una de las construcciones.

## **15 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS**

Todos los valores han sido expresados como la media  $\pm$  error estándar de la media (SEM). Para los análisis estadísticos se empleó el programa InStat 3. Se realizó el test de Student con dos colas y generalmente se consideró estadísticamente significativo un valor de  $p < 0,05$ .

## **16 COMITÉ ÉTICO**

Todos los experimentos que implicaban el uso de modelos animales fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal del Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa, de Sevilla



## IV.RESULTADOS



## **1 CONTRIBUCIÓN DE LOS FACTORES GATA A LA ORGANOGÉNESIS PANCREÁTICA.**

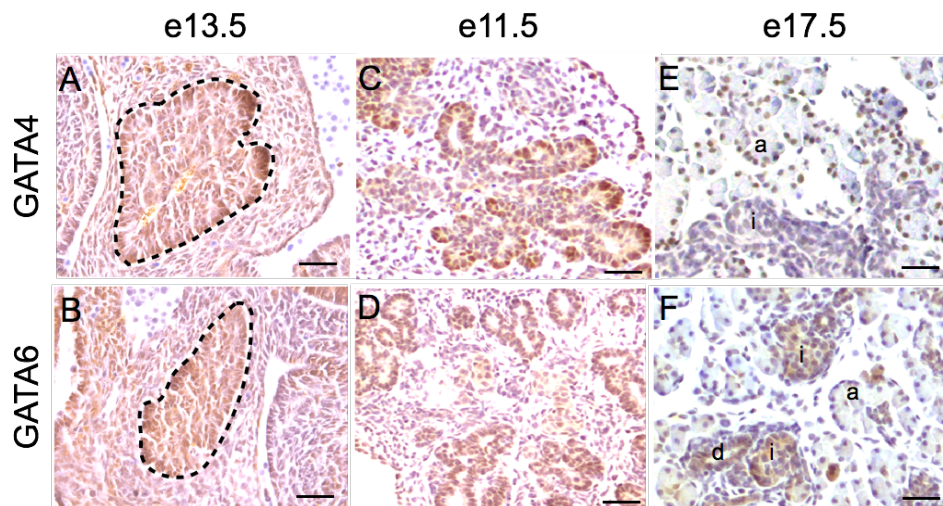
Los estudios en humanos han mostrado que los factores GATA juegan un papel importante en el desarrollo del páncreas. Para estudiar los mecanismos moleculares a través de los cuales los factores GATA participan en la formación del páncreas, realizamos un estudio detallado de la expresión de estos factores a lo largo del desarrollo embrionario pancreático en ratones y para ello usamos modelos de ratón *knockout* condicional para inactivar *Gata4* y *Gata6* específicamente en el endodermo pancreático usando la tecnología Cre/LoxP.

### **1.1. PATRÓN DE EXPRESIÓN DE LOS FACTORES GATA DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO PANCREÁTICO**

Los defectos pancreáticos que presentaban pacientes con mutaciones en los genes *GATA4* y *GATA6* (De Franco et al.; Lango Allen et al.; Shaw-Smith et al., 2014), claramente ponían de manifiesto un papel crucial de estos factores en la formación del páncreas. El primer paso para entender el papel que juegan los factores GATA en la formación del páncreas fue estudiar el patrón de expresión de estos factores de transcripción a lo largo del desarrollo pancreático. Si bien se conoce que los factores de transcripción GATA contribuyen de manera decisiva a la formación de varios órganos derivados tanto del endodermo como del mesodermo (Arceci et al., 1993; Molkentin, 2000; Patient and McGhee, 2002), el patrón de expresión específico de estos factores durante la formación del páncreas no se conocía bien hasta ahora.

En el embrión de ratón, dos miembros de esta familia, *Gata4* y *Gata6*, se coexpresan en la porción del intestino embrionario anterior, incluida la región prepancreática (Molkentin, 2000). A medida que el desarrollo embrionario progresa y da comienzo la especificación pancreática (e8.5-e9), ambos factores se siguen expresando de manera solapante. En estos primeros estadios del desarrollo del páncreas, tras la transición primaria, aparecen en el epitelio pancreático las células progenitoras multipotentes que darán lugar a todos los tipos celulares del páncreas. Más tarde, cuando las yemas pancreáticas ventral y dorsal se fusionan alrededor del e11.5,

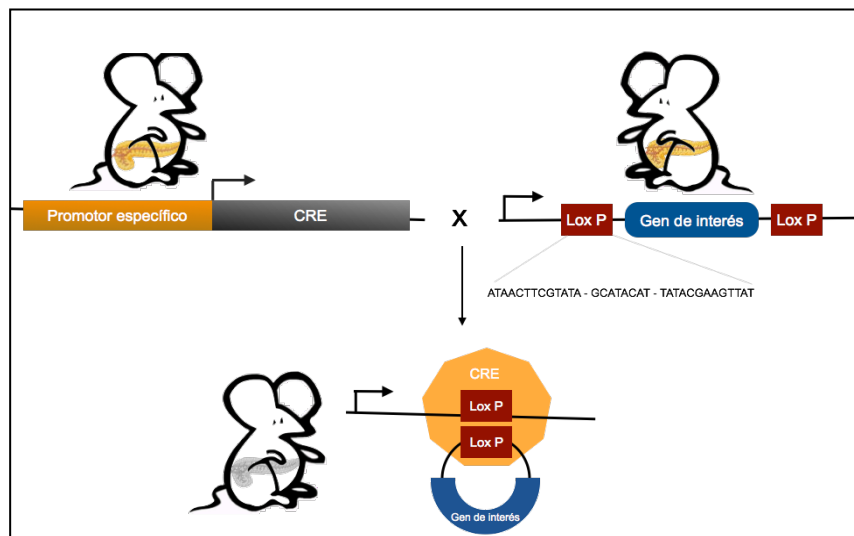
GATA4 y GATA6 se siguen detectando en el epitelio pancreático por técnicas inmunohistoquímicas (Fig. 10, A y B). En este momento del desarrollo del páncreas sucede una reorganización del epitelio pancreático, en la que se desarrolla una estructura epitelial en forma de árbol tubular en las que las células del centro darán lugar al compartimento endocrino-ductal mientras que los extremos darán lugar a células acinares (Fig. 4). En este estadio, alrededor del e13.5, *Gata4* y *Gata6* se continúan expresando en todo el endodermo pancreático (Fig. 10, C y D). Posteriormente, durante la conocida como transición secundaria, los progenitores continúan proliferando y comienzan a diferenciarse hacia sus linajes endocrino, exocrino y ductal (Jorgensen et al., 2007; Pan and Wright). En torno al e17.5, *Gata6* se sigue expresando en todo el epitelio pancreático, acinos, ductos e islotes; mientras que *Gata4* comienza a restringir su expresión a las células pro-acinares (Fig. 10, G y H). Finalmente, en la etapa final de maduración de las células pancreáticas, se observa una clara expresión de *Gata4* en todo el páncreas exocrino, mientras que la expresión de *Gata6* es más intensa en las células endocrinas que en el resto del páncreas.



**Figura 10. Patrón de expresión de los genes *Gata4* y *Gata6* a lo largo del desarrollo embrionario del páncreas de ratón.** Secciones de páncreas de ratón de los estadios embrionarios indicados, teñidos con anticuerpos anti-GATA4 (A, C, E) o anti-GATA6 (B, D, F). En el e11.5 (A, B), el epitelio pancreático expresa *Gata4* y *Gata6* de manera solapada. Más adelante, en el e13.5 (C, D) continúa la expresión solapada en los extremos del epitelio. En los estadios finales del desarrollo, en el e17.5, la expresión de *Gata4* es evidente en los acinos (E) mientras que la proteína GATA6 se detecta más intensamente en los islotes que en las células acinares y ductales (F). (a): acinos, (i): islote, (d): ductos. Barra de error: 50  $\mu$ m

## 1.2. GENERACIÓN DE MUTANTES CONDICIONALES PARA *GATA4* EN EL ENDODERMO PANCREÁTICO.

Para determinar la contribución de cada uno de los factores GATA presentes a lo largo del desarrollo embrionario, se realizaron experimentos de pérdida de función mediante la inactivación condicional cada uno de ellos usando la tecnología Cre-LoxP. Esta tecnología permite la inactivación de un gen específico en un dominio concreto mediante la expresión de la enzima recombinasa Cre (*Cyclization recombination*, ciclación por recombinación) que recombina dos secuencias palindrómicas llamadas secuencias LoxP (*locus X-over P1*). Estas secuencias se insertan flanqueando el gen de interés, de manera que cuando se activa la expresión de la recombinasa Cre, ésta reconoce las dos secuencias LoxP, se produce la recombinación y como consecuencia, la escisión de la región génica flanqueadas por ambas secuencias LoxP (Fig. 11).



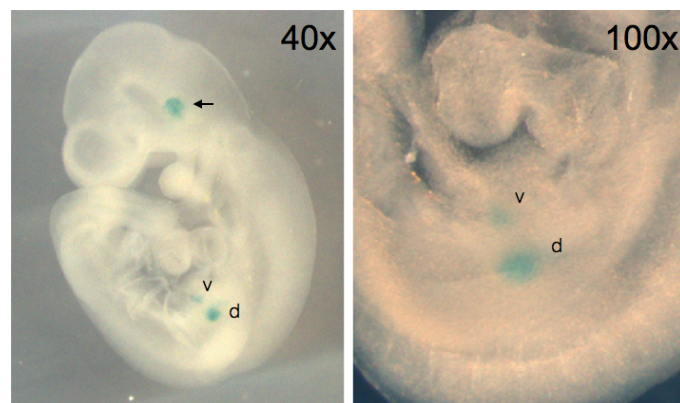
**Figura 11. Esquema representativo de la inactivación condicional mediante la tecnología Cre-LoxP.** Por la acción de la recombinasa Cre se escinde la región del gen flanqueada por los sitios LoxP. Esta excisión se realiza únicamente en aquella región donde esté activado el promotor que dirige la expresión del Cre.

Para generar ratones *Gata4 knockout* condicionales, se usaron ratones que portaban en homocigosis el alelo condicional con la secuencia Lox P (flox) flanqueando los exones 3, 4 y 5 del gen *Gata4* (*Gata4<sup>flox/flox</sup>*) (Fig. 9). Estos ratones ya han sido ampliamente usados con éxito en la literatura para evidenciar la contribución de este

factor de transcripción en distintos tejidos, como corazón y pulmón (Oka et al., 2006) y aparecen descritos en la sección de resultados de esta tesis.

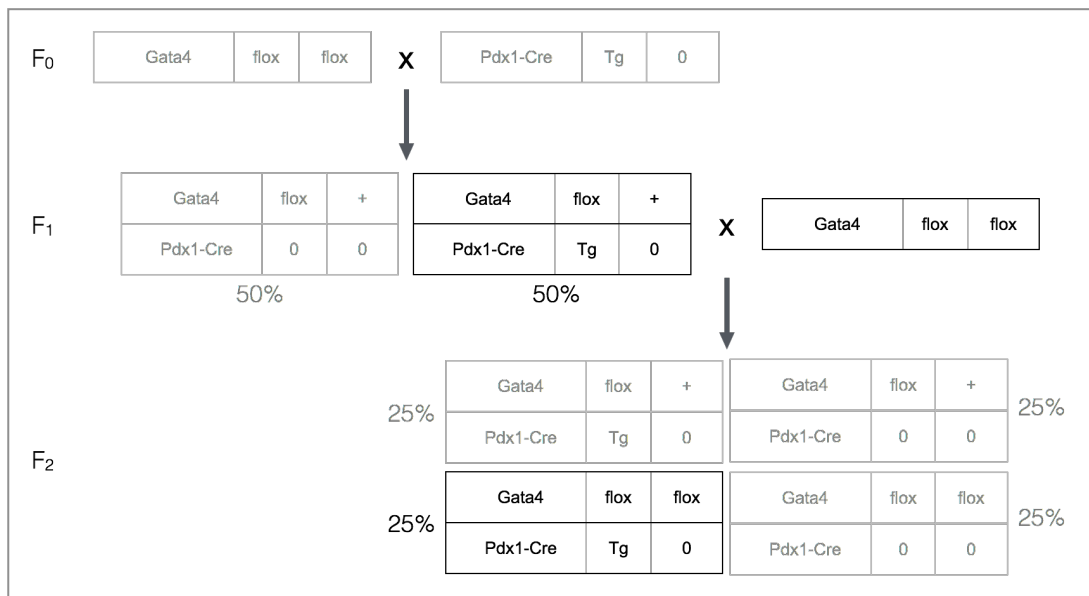
Se cruzaron hembras *Gata4<sup>flox/flox</sup>* con machos de la línea transgénica que expresa la recombinasa Cre bajo el control del promotor del gen *Pdx1* (*Pdx1-Cre*) que dirige la expresión del transgén Cre a los progenitores pancreáticos (Hingorani et al., 2003).

Para determinar la expresión de la recombinasa Cre en nuestro ratón *Pdx1-Cre*, se analizó la descendencia de un cruce de un macho *Pdx1-Cre* con una hembra *Rosa26R-LacZ*. Estos embriones expresan el gen *LacZ* que codifica para la enzima  $\beta$ -galactosidasa en aquellos tejidos donde se expresa la recombinasa Cre (véase Materiales y métodos). Este análisis de la expresión del transgén mostró una tinción positiva para X-gal en el dominio pancreático en los primeros estadios de la especificación pancreática, alrededor del e9.5 (Fig. 12). A este estadio, esta actividad  $\beta$ -galactosidasa se detectó en las dos yemas pancreáticas, ventral y dorsal, así como en el hipotálamo, tal y como ha sido ya descrito (Wicksteed et al.).



**Figura 12. Actividad  $\beta$ -galactosidasa en ratones *Pdx1-Cre*; *ROSA26R*.** Se muestra un embrión de ratón del e9.5 *Pdx1-Cre*; *ROSA26R-LacZ* teñido con X-gal. La actividad  $\beta$ -galactosidasa es específica en las yemas pancreáticas ventral y dorsal (v y d, respectivamente). La expresión del gen reportero *LacZ* también se puede detectar en la región hipotalámica (flecha). Magnificación 40x y 100x.

Para la obtención de los ratones *Gata4* knockout condicionales (*Gata4<sup>flox/flox</sup>*; *Pdx1-Cre*, en lo sucesivo, ratones *Gata4* KO) fueron necesarias dos generaciones de ratones, obtenidos según se describe en la siguiente figura:



**Figura 13. Representación esquemática de la generación de ratones *knockout* condicionales de *Gata4*.** F<sub>0</sub> representa la generación de progenitores que da lugar a la primera generación (F<sub>1</sub>). Los porcentajes representan la frecuencia esperada para cada combinación de genes. La segunda generación (F<sub>2</sub>) surge del cruce de un ratón *Gata4*<sup>flox/+</sup>; *Pdx1-Cre* de F<sub>1</sub> con una hembra *Gata4*<sup>flox/flox</sup>. El 25% de los ratones procedentes de la generación F<sub>2</sub> serán *Gata4* *knockout* condicionales.

Tanto los ratones de la primera generación (F<sub>1</sub>), como de la segunda (F<sub>2</sub>) nacieron según la frecuencia mendeliana esperada, lo que indicaba que la ausencia de *Gata4* en el endodermo pancreático no afectaba a la supervivencia de estos ratones. En la siguiente tabla se muestra la frecuencia de nacimientos de la segunda generación:

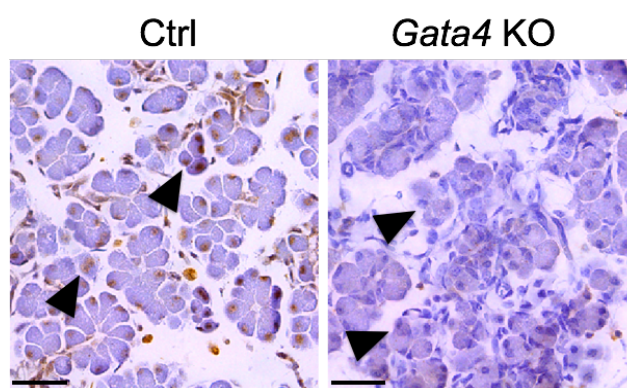
Genotipo	Número de ratones	Porcentaje
<i>Gata4</i> <sup>flox/+</sup>	35	27%
<i>Gata4</i> <sup>flox/+</sup> ; <i>Pdx1-Cre</i>	30	23%
<i>Gata4</i> <sup>flox/flox</sup>	32	24%
<i>Gata4</i> <sup>flox/flox</sup> ; <i>Pdx1-Cre</i>	35	27%
<b>Total</b>	<b>132</b>	<b>100%</b>

**Tabla 2. Frecuencia de nacimiento de ratones durante la generación de ratones *Gata4* KO.** El porcentaje de nacimientos para cada uno de los cuatro genotipos posibles se acerca al 25% esperado.

Los ratones *Gata4*<sup>flox/flox</sup>; *Pdx1-Cre* recién nacidos tenían una morfología normal, un tamaño similar al de sus hermanos de camada, se alimentaban correctamente y no mostraban ningún defecto obvio. Como ratones control, se usaron todos aquellos

ratones que no heredaban el transgén *Pdx1-Cre*, tanto *Gata4<sup>flox/+</sup>* como *Gata4<sup>flox/flox</sup>*. Ambos ratones mostraban unos niveles de expresión *Gata4* similares.

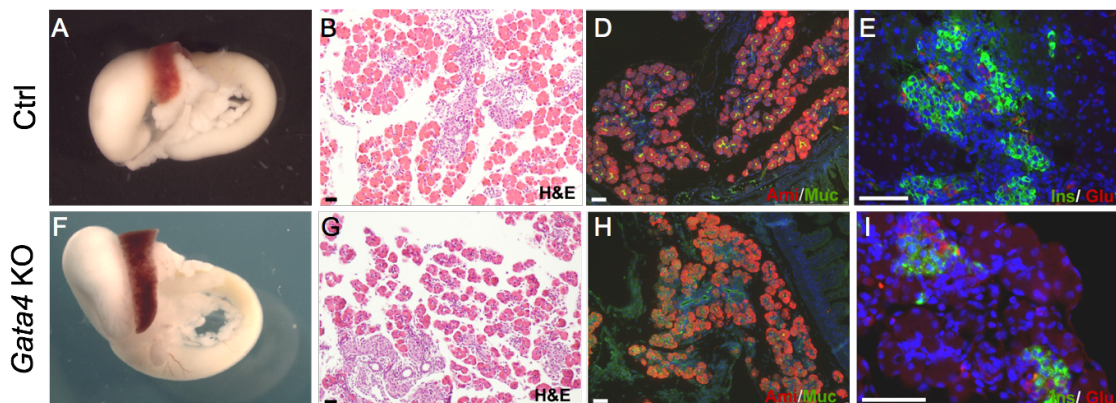
Para demostrar la correcta escisión de los alelos flanqueados por secuencias LoxP y, por lo tanto, la correcta inactivación del gen *Gata4* en el tejido pancreático, se analizó mediante técnicas inmunohistoquímicas la presencia de la proteína GATA4 en páncreas de ratones recién nacidos de un día (P1) *Gata4<sup>flox/flox</sup>; Pdx1-Cre* (Fig. 14).



**Figura 14. Análisis inmunohistoquímico de GATA4 en secciones de parafina de páncreas de ratones control (Ctrl) y ratones *Gata4* KO a estadio P1.** Los ratones Ctrl muestran una tinción de GATA4 específica en los acinos, señalados por flecha. La ausencia de tinción para GATA4 en los ratones *Gata4* KO confirma la correcta inactivación de dicho gen en los mutantes condicionales. Los núcleos están teñidos con hematoxilina. Barra de escala: 50  $\mu$ m

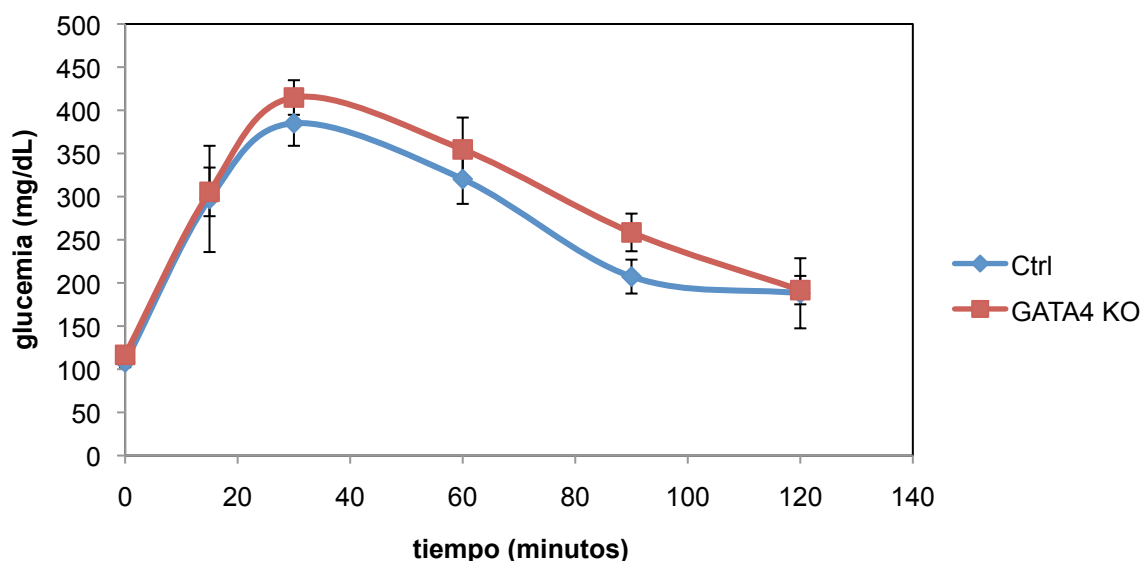
El análisis más detallado y la disección de los páncreas *Gata4* KO de ratones recién nacidos no mostró ninguna anomalía anatómica en la formación de este órgano, comparado con los páncreas de los ratones control (Fig. 15, A y F). Las tinciones con hematoxilina y eosina de cortes histológicos de páncreas de estos ratones no pusieron de manifiesto defectos severos en la morfología y distribución de las células pancreáticas (Fig. 15, B y G). El análisis inmunohistológico usando marcadores específicos para cada linaje pancreático (amilasa para las células acinares, glucagón e insulina para células  $\alpha$  y  $\beta$  respectivamente y mucina para los ductos), no desveló ningún defecto obvio en la diferenciación celular de los páncreas *Gata4* KO comparados con páncreas control (Fig. 15, D, E, H e I).





**Figura 15. Análisis morfológico, histológico e inmunohistoquímico de páncreas de ratones control (Ctrl) y ratones *Gata4* KO.** El estudio anatómico de los páncreas de ratones *Gata4* KO no mostró alteraciones evidentes al compararlos con páncreas de ratones Ctrl (A, F). Del mismo modo, tampoco se observaron diferencias en la histología al teñirlos con hematoxilina y eosina (B, G). La presencia de los distintos tipos celulares pancreáticos (acinos, ductos e islotes) mediante tinciones con anticuerpos específicos para el marcaje de células del linaje exocrino y ductal (ami: amilasa; muc: mucina) (D, H) así como para linaje endocrino (ins: insulina; glu: glucagón) (E, I) indicaba la correcta diferenciación pancreática en los ratones *Gata4* KO de forma similar a la observada en ratones Ctrl. Barra de error: 50  $\mu$ m

Como se ha mencionado anteriormente, los ratones *Gata4* KO alcanzaban la edad adulta, eran fértiles y morían a la misma edad que sus hermanos de camada. En relación con la función endocrina del páncreas los análisis de intolerancia a la glucosa realizados en ratones *Gata4* KO de 8 semanas de edad mostraron una capacidad de metabolizar la glucosa similar a la que mostraron los ratones control (Fig. 16).



**Figura 16. Gráfica de test de tolerancia a la glucosa intraperitoneal en ratones *Gata4* KO y ratones control (Ctrl) de 8 semanas de edad.** La capacidad de los ratones *Gata4* KO de metabolizar la glucosa fue similar a la de los ratones Ctrl.

Todos estos resultados indican que la inactivación condicional de *Gata4* en el endodermo pancreático no afecta a la formación ni al desarrollo del páncreas en ratón, ni altera su función endocrina.

### 1.3. GENERACIÓN DE MUTANTES CONDICIONALES PARA *GATA6* EN EL ENDODERMO PANCREÁTICO.

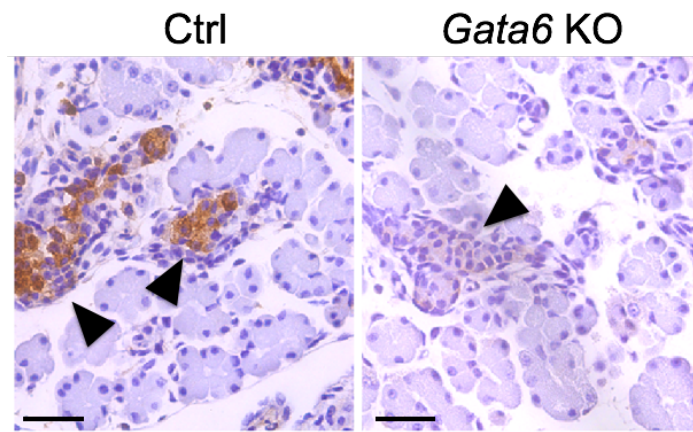
Para determinar el papel de *GATA6* en la formación del páncreas, se inactivó condicionalmente el gen *Gata6* en el endodermo pancreático. Al igual que en el caso de los ratones *Gata4* knockout condicionales, los *Gata6* knockout condicionales se obtuvieron tras dos generaciones, usando la misma estrategia que en el apartado anterior (Fig. 13). En este caso, se usaron ratones con el alelo flox de *Gata6* (*Gata6<sup>flox/flox</sup>*) (Zhang et al., 2008) para la generación de *Gata6<sup>flox/flox</sup>; Pdx1-Cre* (en lo sucesivo, *Gata6* KO). El recuento de ratones nacidos en la segunda generación (F<sub>2</sub>) siguió la frecuencia mendeliana esperada para cada genotipo, tal y como se muestra en la siguiente tabla.

Genotipo	Número de ratones	Porcentaje
<i>Gata6<sup>flox/+</sup></i>	24	28%
<i>Gata6<sup>flox/+</sup>; Pdx1-Cre</i>	20	24%
<i>Gata6<sup>flox/flox</sup></i>	20	24%
<i>Gata6<sup>flox/flox</sup>; Pdx1-Cre</i>	21	25%
<b>Total</b>	<b>85</b>	<b>100%</b>

**Tabla 3. Frecuencia de nacimientos de ratones *Gata6* KO.** En la tabla se muestra los distintos genotipos y frecuencias esperadas y obtenidos de los cruces de ratones para la generación de los ratones *Gata6* KO. En todos los casos, los porcentajes fueron próximos a la frecuencia mendeliana.

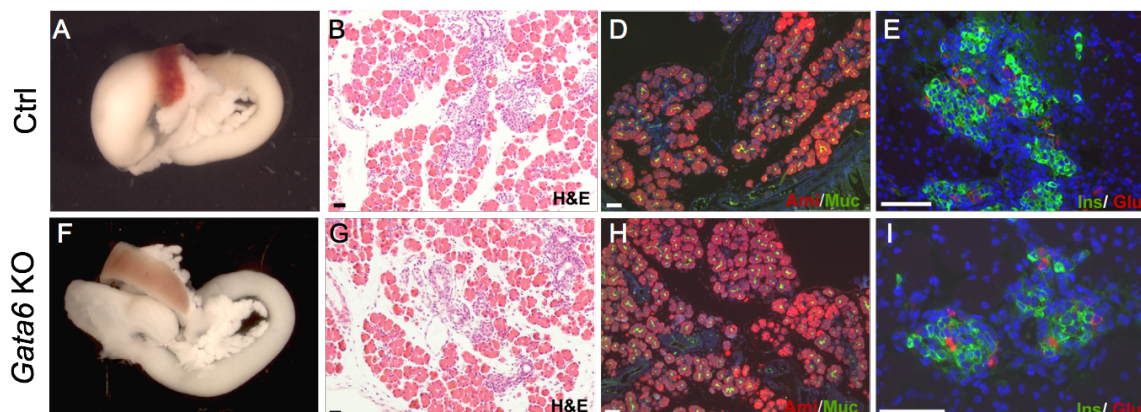
Al igual que en el caso anterior, se comprobó la correcta escisión del alelo floxeado en las camadas de ratones *Gata6<sup>flox/flox</sup>; Pdx1-Cre* mediante la tinción con un anticuerpo específico contra *GATA6* en páncreas de ratones recién nacidos. La ausencia de proteína *GATA6* en los islotes y acinos de los ratones *Gata6* KO reveló una escisión eficiente del gen (Fig. 17).





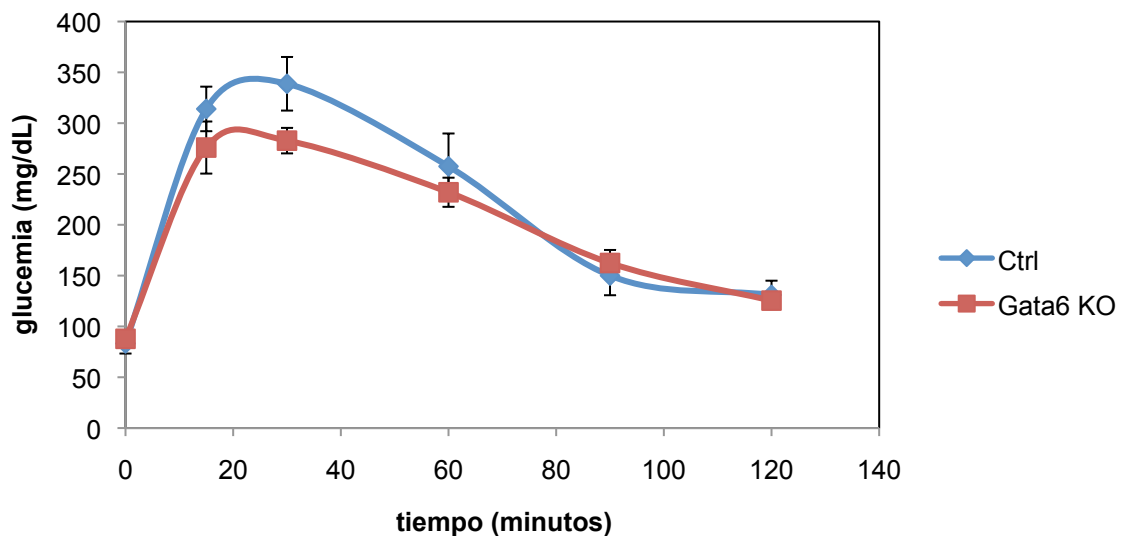
**Figura 17. Análisis inmunohistoquímico de GATA6 en ratones control (Ctrl) y ratones *Gata6* KO a P1.** El análisis inmunohistoquímico para de los páncreas control (Ctrl) muestra una tinción fuerte en los islotes (flechas). La ausencia de tinción para GATA6 en los islotes de los páncreas de ratones *Gata6* KO revela una escisión del gen eficiente. Los núcleos están teñidos con hematoxilina. Barra de escala: 50  $\mu$ m.

Al analizar el fenotipo morfológico de los páncreas en ausencia de GATA6, de forma similar a lo observado en los ratones *Gata4* KO, los ratones *knockout* condicionales para *Gata6* no mostraron ningún defecto en su formación. La morfología y tamaño pancreático de los ratones *Gata6* KO fueron similar a la de los ratones control (Fig. 18, A y F). El análisis histológico mediante tinciones con hematoxilina y eosina mostró un aspecto similar en el tejido acinar y endocrino entre los ratones *Gata6* KO y ratones control (Fig. 18, B y G). Las tinciones inmunohistoquímicas para amilasa, mucina, insulina y glucagón no revelaron ninguna anomalía en la diferenciación de los distintos linajes pancreáticos (Fig. 18, D, E, H e I).



**Figura 18. Análisis morfológico, histológico e inmunohistoquímico de los páncreas de ratones control y *Gata6* KO a P1.** La anatomía y morfología (A, F), y la histología (B, G) de los ratones *Gata6* KO no muestra defectos obvios al compararlos con el control. La expresión de marcadores acinares (ami: amilasa), ductales (muc: mucina) (D, H) y de islotes (ins: insulina, glu: glucagón) (E, I) no muestra ninguna alteración en los páncreas de ratones *Gata6* KO con respecto a la expresión en páncreas de ratones control. Barra de error: 50  $\mu$ m.

El análisis de la función endocrina en ratones *Gata6* KO jóvenes de 8 semanas mediante un test de tolerancia intraperitoneal a la glucosa no reveló diferencias significativas entre los ratones *knockout* y sus respectivos controles (Fig. 19), indicando que en ratones jóvenes la función de las células  $\beta$  no estaba comprometida en ausencia de GATA6.



**Figura 19. Gráfica del test de tolerancia intraperitoneal a la glucosa en ratones *Gata6* KO jóvenes.** Se muestra la gráfica de test realizado en ratones *Gata6* KO y ratones control (Ctrl) de 8 semanas de edad. La disminución de glucosa en sangre a lo largo del tiempo de los ratones *Gata6* KO fue similar a la de los ratones controles (Ctrl).

Todos estos resultados tomados en conjuntos indican que la formación y el desarrollo del páncreas en ratón no están afectados por la inactivación del gen *Gata6*.

#### **1.4. LA INACTIVACIÓN CONJUNTA DE *GATA4* Y *GATA6* EN EL ENDODERMO PANCREÁTICO CAUSA AGENESIA PANCREÁTICA.**

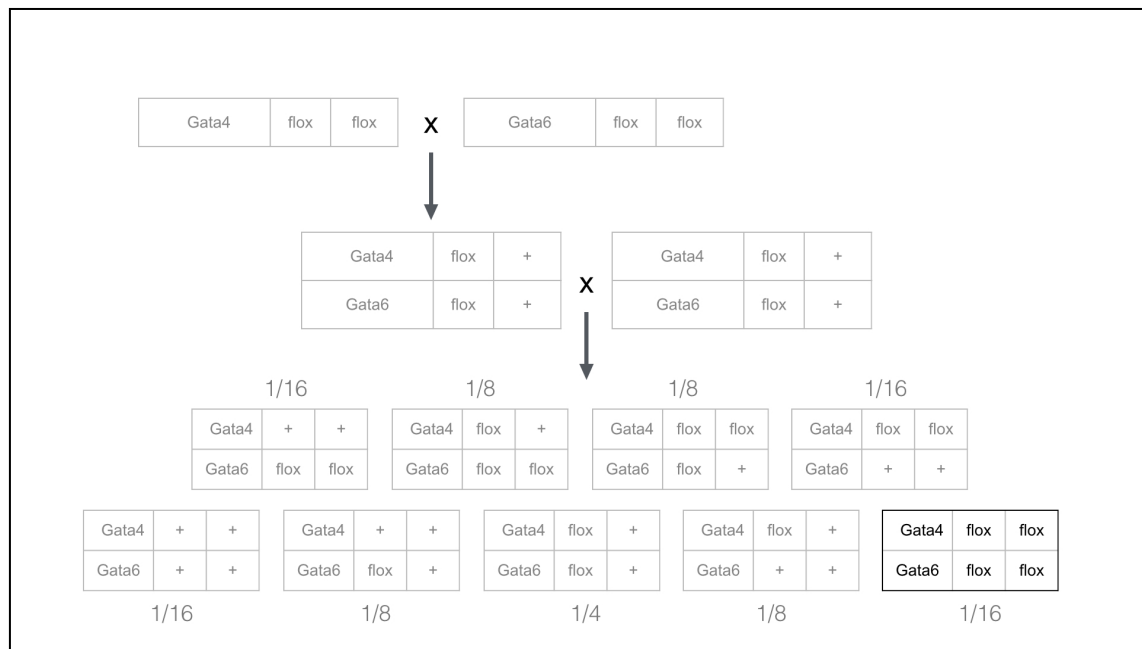
Dado que la inactivación individual de *Gata4* y de *Gata6* en el endodermo pancreático no tiene un efecto en el desarrollo del páncreas y puesto que:

- 1- nuestros resultados muestran la existencia de una expresión solapada de *Gata4* y *Gata6* durante los primeros estadios de la formación del páncreas (Fig. 10)
- 2- todos los factores de la familia GATA reconocen una secuencia consenso común (A/TGATAA/G) en las secuencias reguladores de los genes dianas, que además está considerablemente conservada en el reino animal

hipotetizamos que estos factores pudieran jugar un papel de redundancia funcional durante la organogénesis pancreática.

Para confirmar esta hipótesis, decidimos inactivar conjuntamente la expresión de los dos factores GATA en el endodermo pancreático. Para ello, generamos el ratón con la doble mutación condicional *Gata4*<sup>flox/flox</sup>; *Gata6*<sup>flox/flox</sup>; *Pdx1-Cre* (en lo sucesivo, ratón DKO, ratón doble *knockout*).

Para la obtención de estos ratones DKO fue necesario generar previamente el ratón doble floxeado *Gata4*<sup>flox/flox</sup>; *Gata6*<sup>flox/flox</sup> que se llevó a cabo cruzando ratones individuales *Gata4*<sup>flox/flox</sup> y *Gata6*<sup>flox/flox</sup> durante dos generaciones. La frecuencia de obtención de ratones con ambos genes floxeados fue de 1/16 tal y como se muestra en la siguiente figura:

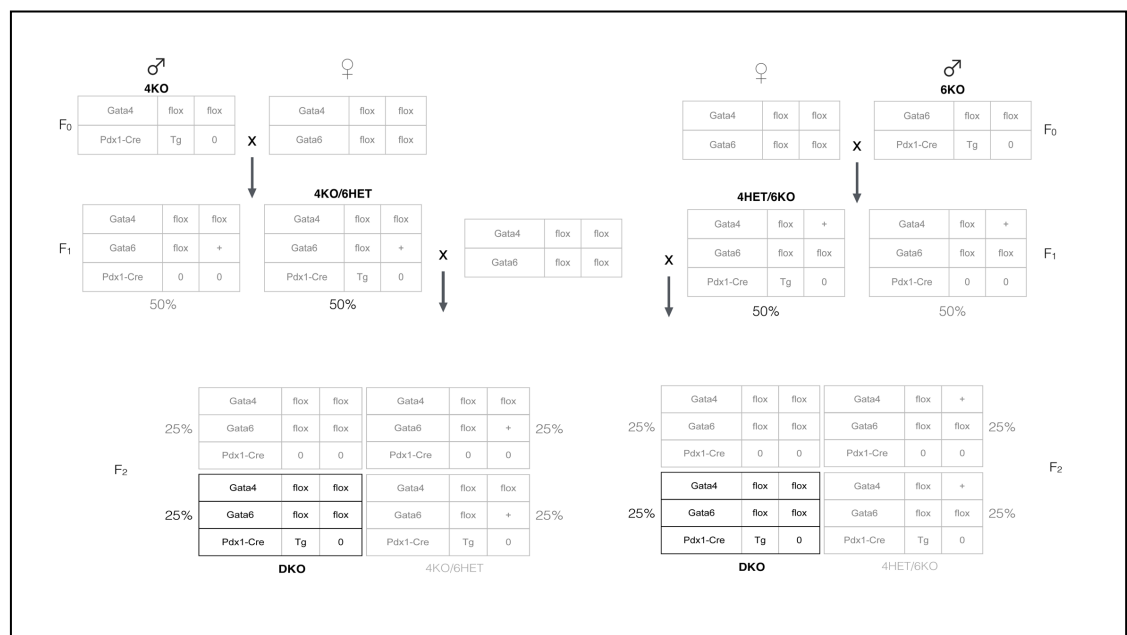


**Figura 20. Representación esquemática de la generación de ratones  $Gata4^{flox/flox}; Gata6^{flox/flox}$ .** El genotipo esperado se obtuvo tras el cruce de dos generaciones con una frecuencia de 1/16.

Una vez obtenidos estos ratones y a lo largo de dos generaciones más, se consiguió inactivar ambos genes *Gata4* y *Gata6* condicionalmente en el endodermo pancreático, generando así el doble *knockout*. Para ello, se cruzaron hembras con el genotipo  $Gata4^{flox/flox}; Gata6^{flox/flox}$  con machos *Gata4* KO o machos *Gata6* KO (véanse apartados 1.2 y 1.3) para conseguir los ratones  $Gata4^{flox/flox}; Gata6^{flox/+}; Pdx1-Cre$  (*knockout* condicionales para *Gata4* y heterocigotos condicionales para *Gata6*, denominados en lo sucesivo como 4KO/6HET) y  $Gata4^{flox/+}; Gata6^{flox/flox}; Pdx1-Cre$  (denominados en lo sucesivo como 4HET/6KO) (Fig. 21), respectivamente. El fenotipo de estos ratones se discute en el apartado 1.6 de esta sección de resultados. Finalmente, para la obtención del ratón DKO, se cruzaron estos ratones 4KO/6HET ( $Gata4^{flox/flox}; Gata6^{flox/+}; Pdx1-Cre$ ) o 4HET/6KO ( $Gata4^{flox/+}; Gata6^{flox/flox}; Pdx1-Cre$ ) con el ratón doble floxeado generado previamente ( $Gata4^{flox/flox}; Gata6^{flox/flox}$ ) para conseguir, con una frecuencia del 25%, ratones  $Gata4^{flox/flox}; Gata6^{flox/flox}; Pdx1-Cre$  (Fig. 21).

Para el genotipado y detección de los alelos floxeados tanto de *Gata4* como de *Gata6* de los ratones se usaron técnicas de PCR. La presencia del transgén *Cre* también fue analizada tanto por PCR como por *Southern blot*.

Como grupo control en estos experimentos se usaron crías de la misma camada que no llevasen el transgén *Cre* y que llevasen los alelos *flox* de *Gata4* o de *Gata6* en homocigosis o en heterocigosis. En investigaciones previas se ha mostrado que estos ratones expresan niveles de GATA4 o de GATA6 similares a un ratón silvestre, por lo que las secuencias *flox* no alteran sus niveles de expresión.

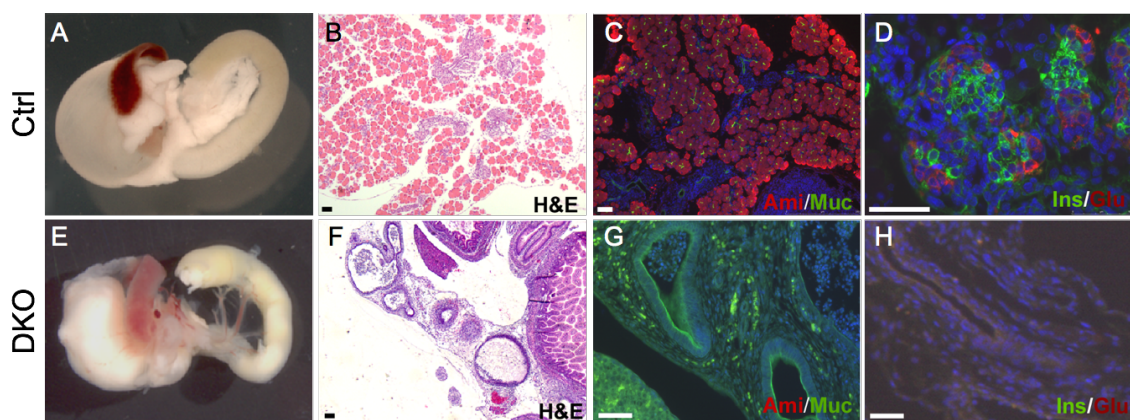


**Figura 10. Representación de la generación de ratones *Gata4/Gata6* doble *knockout*.** Los ratones DKO se obtuvieron siguiendo dos vías distintas, a través del ratón 4KO/6HET o bien de 4HET/6KO. Sin tener en cuenta la estrategia, el porcentaje de ratones DKO generados fue de un 25% para ambas estrategias.

Los ratones DKO nacían a la frecuencia mendeliana esperada, sin embargo presentaban una talla menor con respecto a sus hermanos de camada control. Además, estos ratones presentaban una acusada hiperglucemia y la mayoría morían entre las 24-48 horas del nacimiento.

Un análisis mas exhaustivo de estos ratones mostró deficiencias anatómicas evidentes. Al examinar la cavidad abdominal, estos ratones presentaban una ausencia casi total de tejido pancreático (Fig. 22, A y E). El lugar que debiera ocupar el páncreas estaba remplazado por un tejido quístico y estromal degenerado. Su estudio histológico detallado puso de relieve la ausencia de estructuras pancreáticas

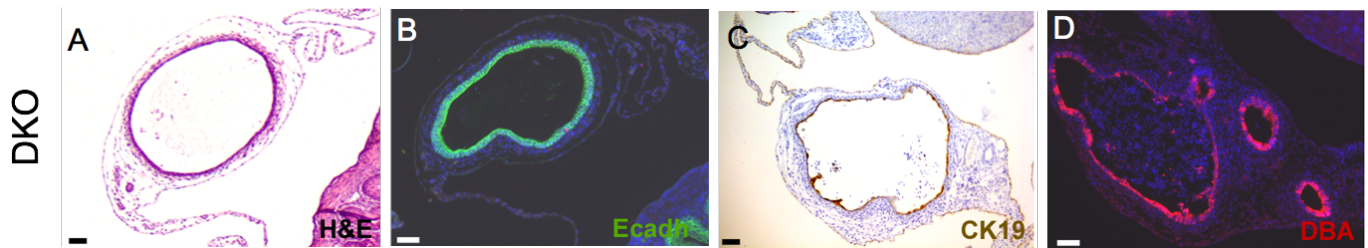
exocrinas o endocrinas (Fig. 22, B y F). El análisis por inmunofluorescencia confirmó la ausencia total de células de origen exocrino. No se observó señal alguna al teñir cortes de secciones representativas de estos tejidos con anticuerpos específicos de acinos maduros, como la amilasa (Fig. 22, C, G). De igual manera, la ausencia total de tejido endocrino se ponía de evidencia al no encontrarse ninguna célula que expresase hormonas pancreáticas como la insulina o glucagón (Fig. 22, D, H). La ausencia de islotes explicaba la hiperglucemia severa y la muerte a las pocas horas de vida de los ratones neonatos.



**Figura 22. Análisis anatómico, histológico e inmunohistoquímico de ratones DKO.** El análisis histológico a P1 de los páncreas de ratones doble *knockout* reveló la ausencia de tejido pancreático acinar o endocrino. En ratones DKO aparece un tejido quístico en el espacio anatómico donde debiera alojarse el páncreas (**A, E**). El análisis histológico reveló la presencia de tejido ductal degenerado pero la ausencia total de acinos o islotes (**B, F**). El análisis por inmunofluorescencia evidencia la ausencia de células acinares y endocrinas (**C, G, D, H**). Barra de escala: 50  $\mu$ m.

Un estudio inmunohistoquímico más detallado de este remanente pancreático reveló la presencia de células epiteliales de naturaleza ductal en este tejido. Estas estructuras quísticas expresaban marcadores ductales de células maduras como mucina (Fig. 22, G), citoqueratina 19 (CK19), E-cadherina (Ecadh) y la reacción positiva contra la lectina DBA (aglutinina de *Dolichos bliflorus*) (Fig. 23).



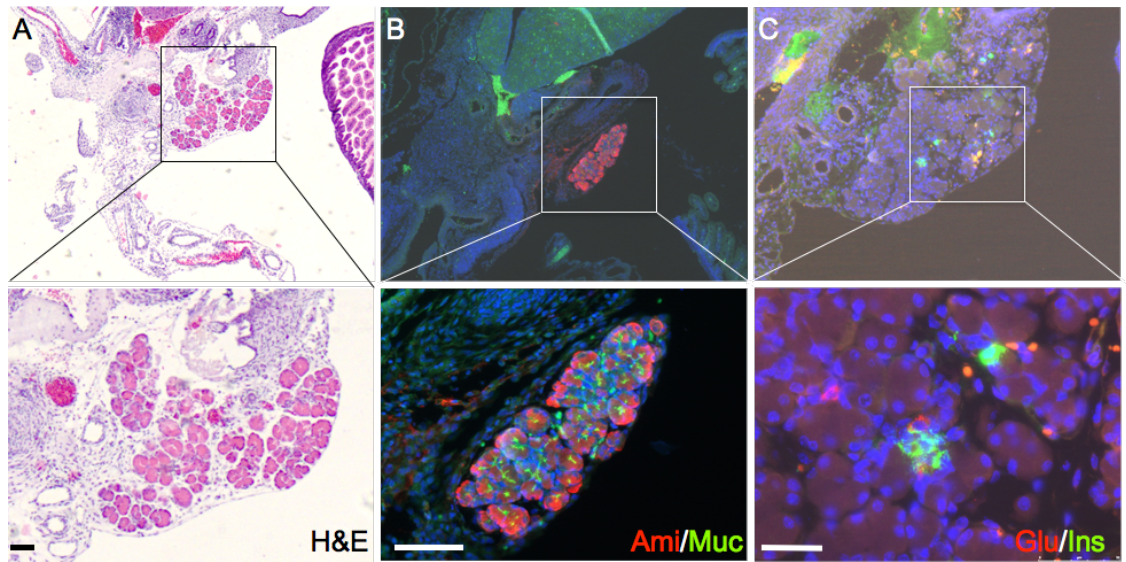


**Figura 23. El análisis histológico e inmunohistoquímico del quiste presente en ratones DKO.** El análisis mediante tinciones con hematoxilina y eosina **(A)** confirmó la ausencia de tejido acinar o endocrino. La tinción con anticuerpos específicos reveló la naturaleza ductal de la estructura quística por la expresión de marcadores ductales como citokeratina 19 (CK19) **(C)** o la reactividad positiva ante la lectina DBA **(D)**. La tinción positiva para E-caderina **(B)** confirma su naturaleza epitelial. Barra de escala: 50μm.

Todos estos resultados tomados en conjunto indican que los factores GATA, que intervienen decisivamente en la formación y desarrollo del páncreas, de forma que GATA4 y GATA6 juegan un papel redundante. Mientras que la inactivación individual de *Gata4* o de *Gata6* no tiene un efecto en la formación del páncreas, la inactivación conjunta de ambos genes causa agenesia pancreática en ratones. Esta redundancia funcional sería posible dado solapamiento de la expresión de ambos factores durante los primeros estadios de la organogénesis pancreática y el reconocimiento de la misma secuencia consenso en los promotores de genes diana por parte de ambos factores de transcripción.

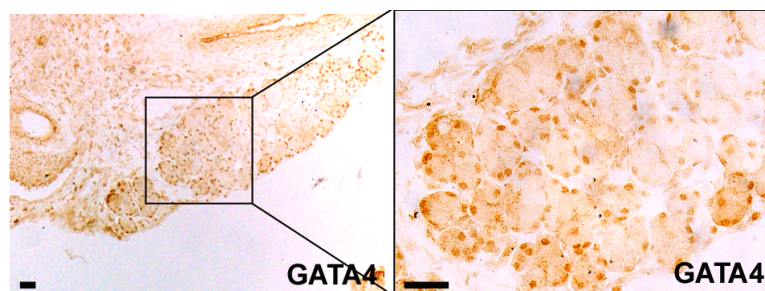
### 1.5. MOSAISCISMO EN LA ESCISIÓN DE LOS SITIOS LoxP POR LA RECOMBINASA CRE

Aunque en un porcentaje muy alto los ratones deficientes para *Gata4* y *Gata6* nacían sin páncreas, alrededor del 20% de las crías nacían con un páncreas severamente hipoplástico. El análisis histológico e inmunohistoquímico de estos páncreas mostró la presencia de células totalmente diferenciadas (Fig. 24) que expresaban marcadores de células tanto endocrinas, exocrinas como ductales maduras.



**Figura 24. Análisis histológico e inmunohistoquímico de los páncreas de ratones mosaico.** Tinciones mediante hematoxilina y eosina (A) y anticuerpos específicos contra amilasa y mucina (B) y glucagón e insulina (C) muestran la presencia de células diferenciadas en los páncreas hipoplásticos de ratones doble knockout. Los paneles inferiores muestran una magnificación de los paneles superiores. Barra de escala: 50  $\mu$ m

Mediante técnicas inmunohistoquímicas se demostró que estas células expresaban GATA4 (Fig. 25) y GATA6. Estos resultados indicaban que estas células habían *escapado* de la excisión de los alelos floxeados de *Gata4* y *Gata6* mediada por la recombinasa Cre. La actividad de la recombinasa Cre en el modelo transgénico de ratón *Pdx1-Cre* ha mostrado fenotipos de mosaicismo en la literatura (Hingorani et al., 2003). Es posible que una población de células *Gata4*<sup>+</sup> y/o *Gata6*<sup>+</sup> que hayan eludido la recombinación hayan sido capaces de repoblar, al menos parcialmente, el páncreas de ratones DKO.



**Figura 25. Secciones de páncreas de ratones DKO teñidos con GATA4.** Nótese la tinción positiva para GATA4 en los núcleos de los acinos pancreáticos. Barra de error: 50  $\mu$ m

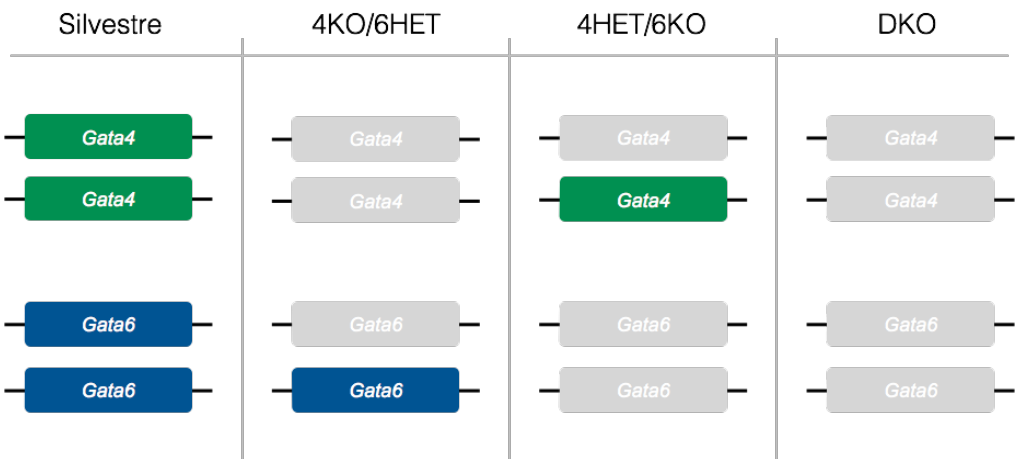


La presencia de este remanente explica que algunas de las crías DKO sobrevivieran a las primeras horas tras el nacimiento, e incluso algunas fueran capaces de alcanzar la edad adulta.

### 1.6. DIFERENCIAS FENOTÍPICAS EN EL PÁNCREAS DE RATONES SEGÚN LA DOSIS ALÉLICA DE *GATA4* Y *GATA6*.

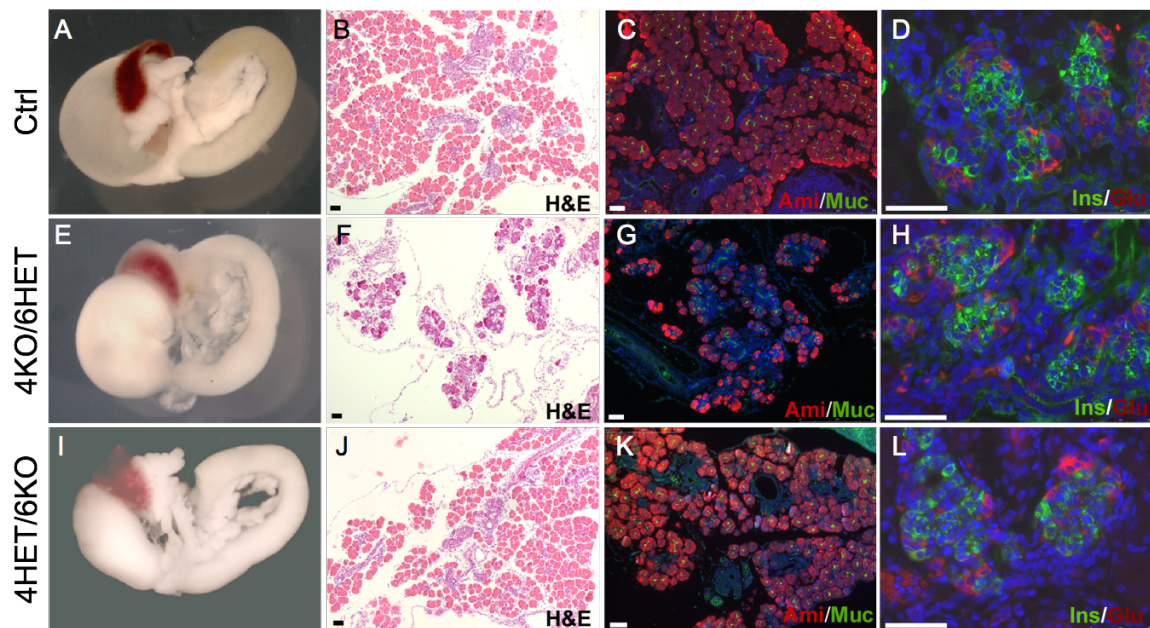
Tal y como se explica en capítulos anteriores, para conseguir generar el ratón doble *knockout* condicional para *Gata4* y *Gata6* fue necesario un intenso trabajo de cría y cruces. Tanto en las generaciones previas a la obtención definitiva del ratón doble *knockout* como en un 25% respectivamente de crías de la misma camada, aparecieron genotipos intermedios de inactivación condicional de los genes de estudio. Estos ratones portaban uno de los genes *Gata* inactivado condicionalmente en homocigosis, mientras que el otro sólo aparecía inactivado en heterocigosis, es decir, mantenían una copia del gen activa.

De esta manera, nos encontramos con el ratón *Gata4<sup>flox/flox</sup>; Gata6<sup>flox/+</sup>; Pdx1-Cre*, en el que el factor *Gata4* está totalmente inactivado, mientras que *Gata6* conserva la expresión de uno de los alelos. En este trabajo será nombrado como *Gata4 knockout/Gata6* heterocigoto o 4KO/6HET. De manera análoga, el genotipo intermedio *Gata4<sup>flox/+</sup>; Gata6<sup>flox/flox</sup>; Pdx1-Cre*, cuyo gen *Gata6* está inactivado y solo se expresa una copia del gen *Gata4* se nombrará como *Gata4* heterocigoto/*Gata6 knockout* o 4HET/6KO (Fig. 26).



**Figura 26. Representación de la dosis alélica de *Gata4* y *Gata6* en los diferentes genotipos.** En el ratón silvestre aparecen los dos alelos floxeados de cada uno de los genes *Gata4* (color verde) y *Gata6* (color azul). La escisión de los alelos por la acción de la recombinasa se representa en color gris. Los ratones 4KO/6HET tiene escindidos los dos alelos *Gata4* y un alelo *Gata6*. Los ratones 4HET/6KO tienen escindidos los dos alelos de *Gata6* y un alelo de *Gata4*. Finalmente, el ratón DKO tiene los cuatro alelos escindidos.

Los ratones 4KO/6HET recién nacidos presentaban una reducción considerable de la masa pancreática (Fig. 27, E-H). El estudio histológico manifestó una disminución del tejido exocrino así como defectos en la arquitectura acinar. Sin embargo, en los ratones 4HET/6KO no se observó ningún defecto en la arquitectura, morfología o histología pancreática (Fig. 27, I-L).



**Figura 27. Las distintas combinaciones de dosis alélica entre *Gata4* y *Gata6* tienen distintos fenotipos pancreáticos.** Los ratones 4KO/6HET presentan hipoplasia pancreática y un menor tamaño del compartimento exocrino (**B, F**) así como una disminución de la expresión de marcadores acinares (**F, G**) comparados con el control (**C**) y con los ratones 4HET/6KO (**J, K**), que muestran un tejido exocrino normal. La tinción con insulina y glucagón muestra una correcta diferenciación endocrina en ambos casos, 4KO/6HET (**H**) y 4HET/6KO (**L**), comparadas con el control (**D**). Barra de escala: 50  $\mu$ m

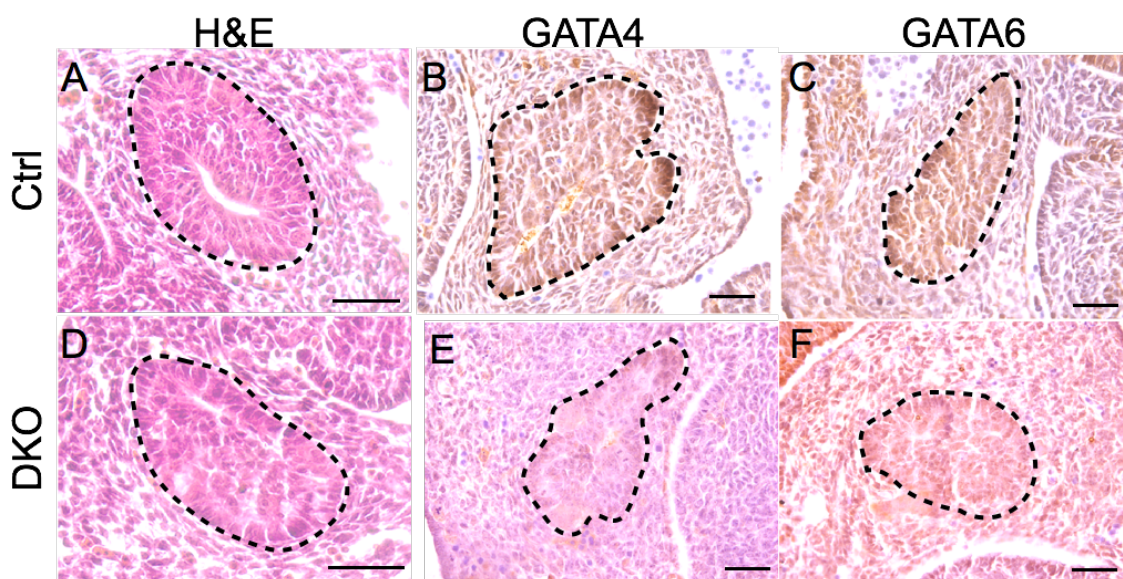
Una vez demostrado el papel de redundancia funcional entre GATA4 y GATA6 y teniendo en cuenta estos resultados, queda claro que el papel que juegan dentro de la organogénesis pancreática no es totalmente equivalente, ya que solo un alelo de *Gata4* en ausencia de *Gata6* es capaz de dirigir la formación del páncreas de manera correcta. Sin embargo, un solo alelo de *Gata6* no es capaz de compensar la falta de su parólogo. Estos ratones al nacer presentan un páncreas hipoplástico y se observan defectos en la formación de los acinos. Estos datos sugieren que la presencia de GATA6 durante la formación del páncreas es más determinante que la de GATA4.

## 2 BLOQUEOS EN LA EXPANSIÓN DEL EPITELIO PANCREÁTICO EN AUSENCIA DE GATA4 Y GATA6.

### 2.1. DEFECTOS EN LA FORMACIÓN Y DESARROLLO DEL EPITELIO PANCREÁTICO EN RATONES DOBLE *KNOCKOUT*.

Tal y como se observó en ratones recién nacidos, la ausencia de ambos factores *Gata4* y *Gata6* en el endodermo pancreático provocaba un defecto en la formación y desarrollo de este órgano en ratones. Esta agenesia pancreática era consecuencia de un fallo durante del desarrollo embrionario. Para poder determinar el momento preciso de la formación de este órgano en el que se produce el fallo, analizamos páncreas embrionarios de ratones mutantes para *Gata4* y *Gata6* en distintos estadios de formación. Hay que tener en cuenta que para la inactivación condicional de los genes *Gata4* y *Gata6* floxeados nos valimos del ratón *Pdx1-Cre* que tal como se explica en el apartado anterior y ha sido previamente descrito (Hingorani et al., 2003) se expresa en momento de la especificación pancreática. De hecho, la expresión de *Pdx1* (junto con *Ptf1a*) en una porción concreta del tubo digestivo embrionario se considera el inicio del programa pancreático (Chiang and Melton, 2003; Kawaguchi et al., 2002). Este hecho limita la determinación del papel que pudieran estar jugando estos factores GATA en el endodermo definitivo con respecto a la especificación pancreática.

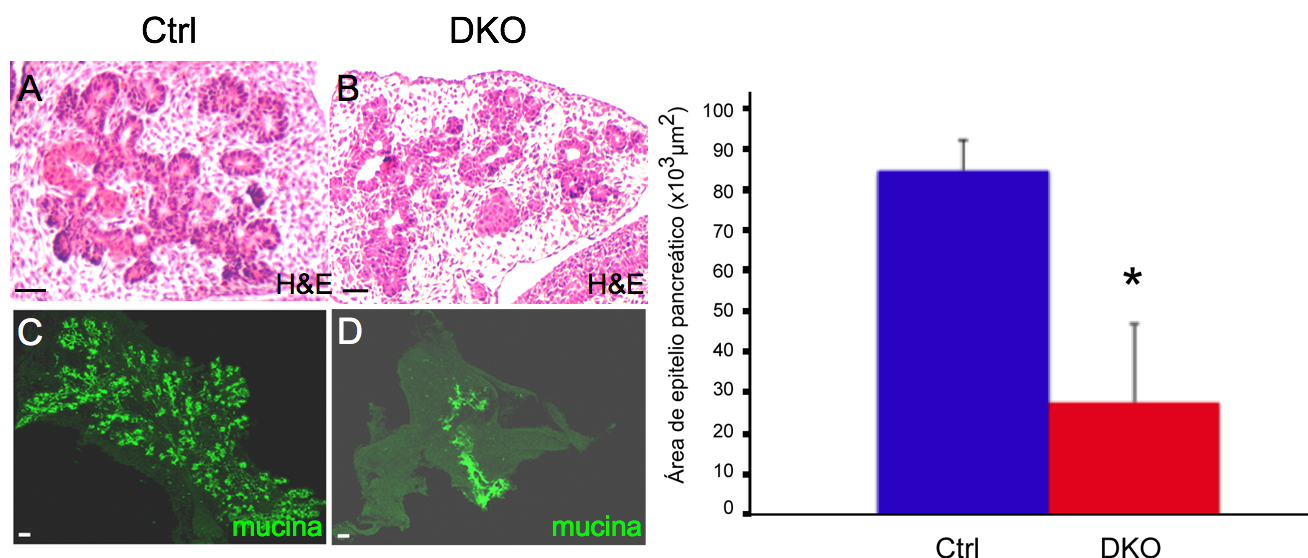
En los primeros estadios de la formación, alrededor del e11.5, el páncreas embrionario formado por la unión de las dos yemas dorsal y ventral expresa de manera solapante GATA4 y GATA6 (véase apartado 1.1). La ausencia de GATA4 y GATA6 no desveló ninguna alteración morfológica al analizar tejidos embrionarios de ratones doble *knockout* de este estadio (Fig. 28, A y D). Se comprobó mediante técnicas inmunohistoquímicas que la inactivación de los genes había sido correcta. En casi la totalidad de los embriones con genotipo *Gata4*<sup>flox/flox</sup>; *Gata6*<sup>flox/flox</sup>; *Pdx1-Cre* la detección de las proteínas fue indetectable (Fig. 28, B, C, E y F).



**Figura 28. Secciones representativas de páncreas embrionarios en el e11.5 de ratones control (Ctrl) y doble knockout (DKO) teñidos hematoxilina y eosina y con anticuerpos específicos contra GATA4 y GATA6.** A este estadio del desarrollo, la ausencia de proteína GATA4 (**D**) y de GATA6 (**E**) en las yemas pancreáticas de los ratones DKO reflejan la inactivación eficiente de ambos genes. El epitelio pancreático de los embriones DKO muestran una morfología y tamaño similar al de los ratones controles (Ctrl) (**A, D**). Barra de escala: 50  $\mu$ m

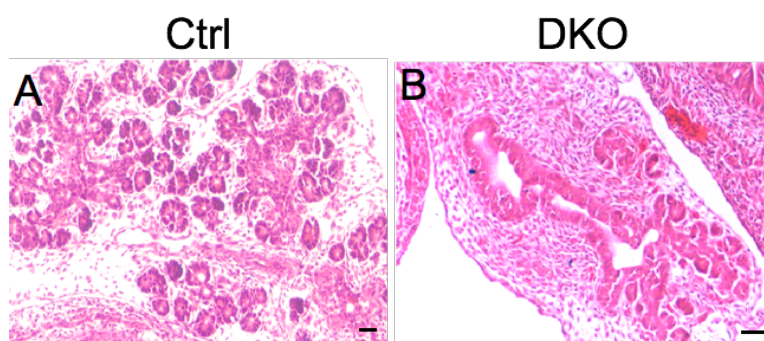
Durante la ola de proliferación y diferenciación que ocurre alrededor del e13.5, el páncreas del embrión mutante presenta los primeros indicios de defectos en la expansión y organización de el epitelio tubular, al compararlo con los embriones control, según se observa en las tinciones con hematoxilina y eosina de cortes histológicos representativos (Fig. 29, A y B). Esta disminución en el tamaño, así como el fallo en la ramificación y expansión del árbol epitelial es más evidente al teñir las muestras de páncreas embrionarios enteros con un anticuerpo específico contra la mucina. Las imágenes al microscopio desvelaron un un arbol epitelial pobre en embriones DKO. Al cuantificar el área teñida por este anticuerpo anti-mucina, las diferencias entre el doble *knockout* y el control fueron significativas (Fig. 29, C y D).





**Figura 29. Morfología y cuantificación del área epitelial de embriones *Gata4/Gata6* knockout.** Páncreas embrionarios representativos de control (Ctrl) o ratones doble *knockout* (DKO) en el e13.5 teñidos con hematoxilina y eosina (**A, B**). En este estadio se comienzan a observar fallos en la ramificación y expansión del epitelio. Al incubar estas muestras con un anticuerpo específico para mucina (**C, D**) se pone de manifiesto el bloqueo de la expansión del árbol epitelial. La cuantificación del área de epitelio pancreático muestra una reducción significativa en los embriones DKO al compararlo con el epitelio de embriones control (Ctrl) . \*p value < 0,05. Barra de escala: 50 μm

De la misma manera, al analizar la evolución del páncreas en estadios posteriores (e.15.5), se comprobó que los embriones con la doble mutación presentaban páncreas cada vez más afectados, con un epitelio atrofiado y desorganizado (Fig 30) en los que se observaba un lumen dilatado y una estructura de naturaleza ductal, que daría lugar a la estructura quística y estromal que se observó en el lugar del páncreas de estos ratones DKO al nacer.



**Figura 30. Secciones teñidas con hematoxilina y eosina de páncreas de embriones de e15.5.** Los epitelios de embriones DKO (**B**) tienen un aspecto quístico y desorganizado, donde se comienza a reconocer la formación de un ducto degenerado, comparados con el epitelio del embrión control (Ctrl) (**A**). Barra de escala: 50 μm

La agenesia detectada en ratones recién nacidos con una inactivación condicional de *Gata4* y *Gata6* en el endodermo pancreático tiene su origen, por tanto, en un defecto en la morfogénesis durante los estadios intermedios del desarrollo del páncreas, alrededor del estadio embrionario e13.5.

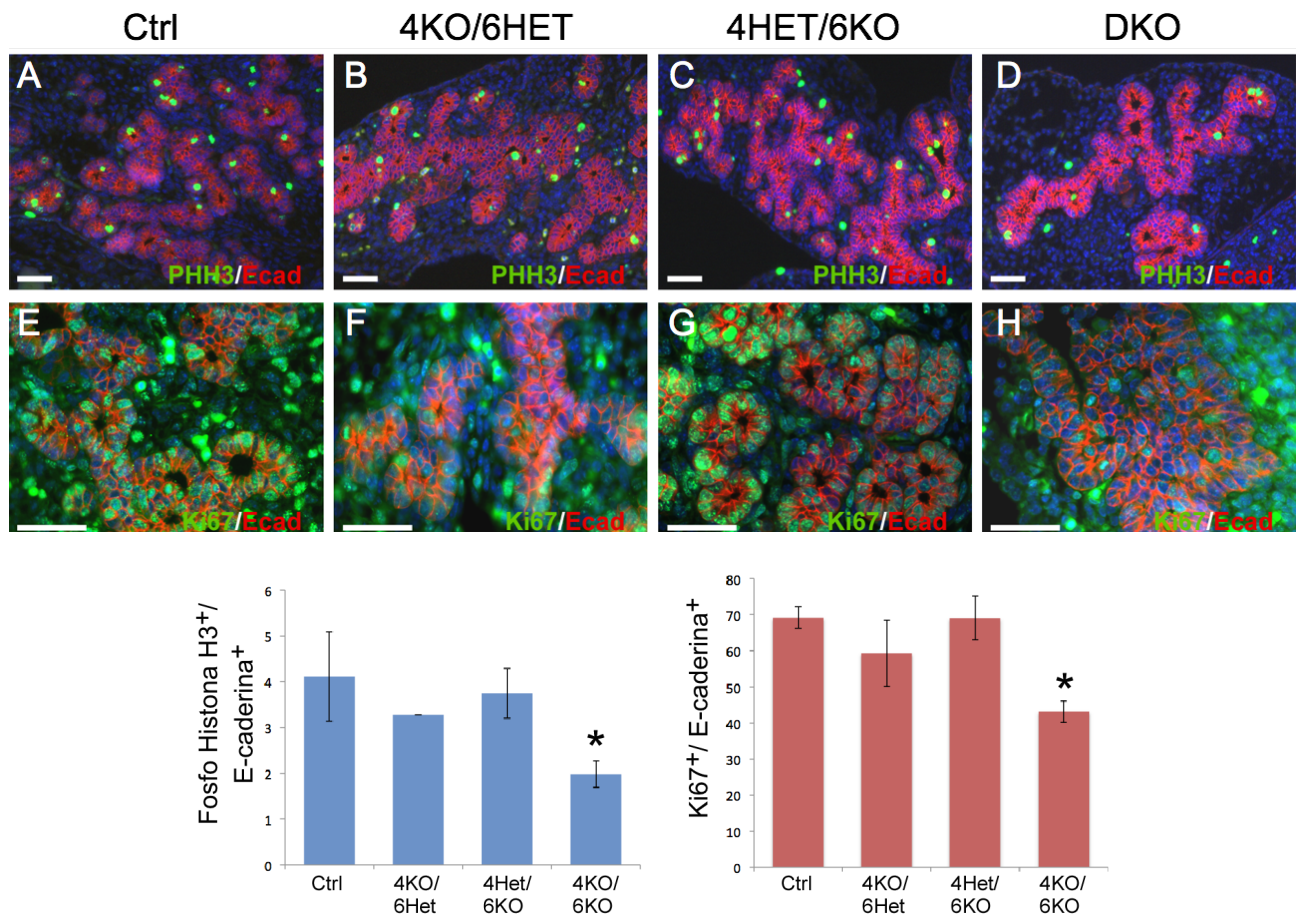
## **2.2. LOS RATONES DOBLE *KNOCKOUT* PRESENTAN DEFECTOS EN LA PROLIFERACIÓN DE LAS MPCs.**

Durante los primeros estadios de la formación del páncreas ocurre una proliferación masiva de las células multipotentes pancreáticas. El tamaño final del órgano dependerá básicamente del tamaño del *pool* de células resultante de la proliferación que ocurre durante estos primeros pasos en el desarrollo del páncreas (Zhou et al., 2007). Más tarde, durante la transición secundaria, estos progenitores continúan creciendo y expandiéndose hasta formar una estructura tubular ramificada.

Como se ha visto en el apartado anterior, los ratones con la doble mutación en *Gata4* y *Gata6* no son capaces de formar el epitelio pancreático ramificado y se bloquea su crecimiento y su expansión. Para determinar si esto pudiera deberse a un fallo en la proliferación de las células progenitoras, realizamos una tinción con anticuerpos específicos de división celular en páncreas embrionarios de e13.5: el marcador de mitosis fosfohistona H3 (PHH3, del inglés *phospho-Histone H3*) y el marcador de proliferación Ki-67. Mientras que la proteína Ki-67 marca los núcleos de células que se encuentran en fases activas del ciclo celular ( $G_1$ , S,  $G_2$  y M) (Scholzen T, 2000), el marcador PHH3 se detecta en todas las células que se encuentran en mitosis (Hendzel MJ, 1997)

La cuantificación de las señales de PHH3 de los ratones DKO comparados con los respectivos controles resultó en una disminución cercana al 50% en el área epitelial pancreática (delimitada por el marcador E-cadherina) (Fig. 31, A-D). Los resultados se confirmaron al usar Ki67 como marcador de proliferación (Fig. 31, E-H). En ambos casos la disminución fue estadísticamente significativa.

Con respecto a los fenotipos intermedios, hay que resaltar la disminución en el área positiva para estos marcadores de proliferación en el caso del ratón 4KO/6HET (Fig 31, B y F), que aunque no es estadísticamente significativa, si muestra una clara tendencia y podría ser responsable de la hipoplasia pancreática que muestran estos ratones al nacer.



**Figura 31. Análisis de la proliferación en páncreas embrionarios del e13.5.** El análisis por inmunofluorescencia del marcador de mitosis fosfohistona-H3 (PHH3) (A-D) refleja una disminución significativa de células proliferativas en páncreas de embriones DKO a e13.5, comparadas con los demás genotipos. Estos resultados se confirman al marcar las células con un anticuerpo anti-Ki67 (E-H). La cuantificación de las células en proliferación se expresa como el número de células PHH3+ o Ki67+ con respecto a las células epiteliales totales, delimitadas por el marcador E-caderina. \*p value<0,05. Barra de escala: 50  $\mu$ m

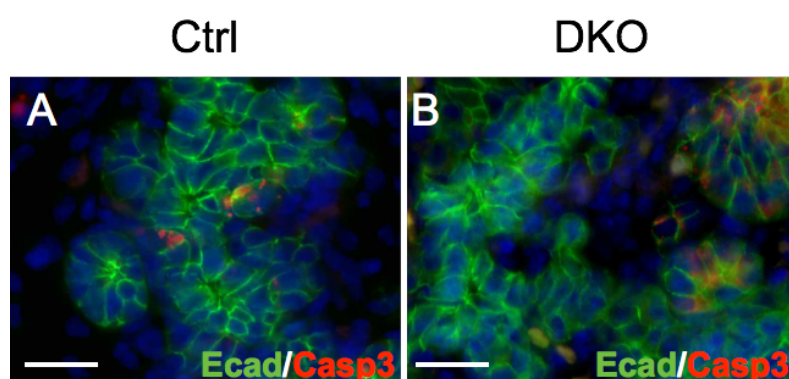
Estos resultados indican que *Gata4* y *Gata6* son necesarios para la correcta proliferación y expansión de las células epiteliales pancreáticas durante los estadios intermedios en la formación de este órgano. La ausencia de estos factores de transcripción en los MPCs conduce a una drástica reducción de células dentro del

ciclo celular y en mitosis. Este defecto es, al menos en parte, causa directa de la agenesia pancreática que se observa en los ratones doble *knockout* al nacer.

### **2.3. LA TASA DE APOPTOSIS CELULAR EN EL EPITELIO PANCREÁTICO DE LOS RATONES DOBLE *KNOCKOUT* ES SIMILAR A LA DE LOS RATONES CONTROL.**

Una posible causa de la disminución de la masa celular que forman los progenitores multipotentes del páncreas podría ser un aumento de la muerte celular. Tal y como se ha visto en otros casos de hipoplasia severa de páncreas, un aumento en la apoptosis junto con defectos en proliferación, diferenciación e identidad celular han sido responsables de este defecto, como en los casos de la inactivación de *Sox9* y *Hnf1 $\beta$*  (Seymour et al., 2007) (De Vas et al., 2015). En otras ocasiones esta disminución o ausencia de tejido pancreático no va aparejada a un incremento de la apoptosis (Krapp et al., 1998)

En el caso de los ratones DKO, la reducción drástica del área pancreática no se asoció a un aumento de la apoptosis (Fig. 32). A través de la tinción inmunológica con caspasa 3 activada, no se detectó un aumento de células en apoptosis en páncreas de e13.5 de ratones DKO frente al control.



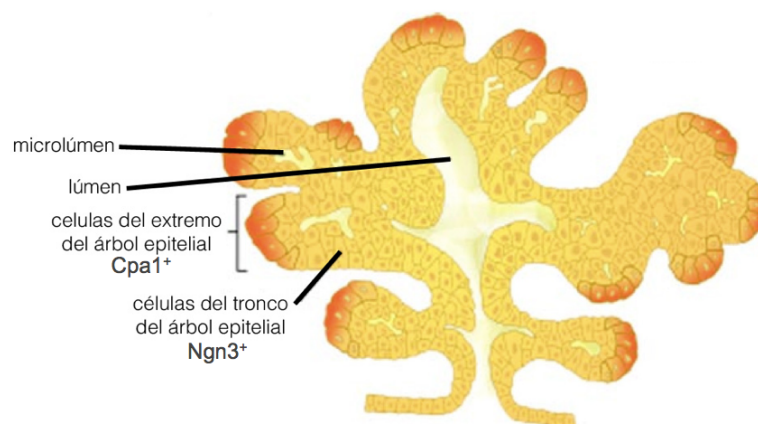
**Figura 32. Análisis inmunohistoquímico del marcador de apoptosis Caspasa3 activada en secciones de páncreas embrionarios de e13.5.** Los niveles de células apoptóticas en embriones DKO fueron similares a los del control. Barra de escala: 50  $\mu$ m

Ya que esta disminución de la población de precursores pancreáticos no se debía a un aumento de la muerte celular, ésta podía deberse a la disminución en la proliferación, a un bloqueo en la diferenciación o a una posible migración de estas células (Xuan et al., 2012)



## 2.4. LAS CÉLULAS DEL ENDODERMO PANCREÁTICO PRESENTAN DEFECTOS EN LA DIFERENCIACIÓN EN AUSENCIA DE GATA4 Y GATA6

Así como en los primeros estadios del desarrollo del páncreas se produce una oleada de proliferación en la que los progenitores pancreáticos proliferan y se expande la yema pancreática, en una segunda fase de la formación de este órgano, además de continuar proliferando, las células multipotentes del epitelio pancreático comienzan a adquirir propiedades de la que será su destino final. En esta etapa, la remodelación del epitelio pancreático durante este proceso está íntimamente ligada a la aparición de los distintos dominios en el epitelio pancreático ductal. La expresión de ciertas señales intrínsecas y extrínsecas que delimitaran los distintos compartimentos del páncreas embrionario (Schaffer et al.). Las células multipotentes, localizadas en los extremos, avanzan a medida que se va ramificando el árbol epitelial. Los progenitores que se localicen en el extremo del árbol epitelial darán lugar a las células acinares y las células que permanezcan a lo largo del tronco generarán los progenitores endocrino-ductales (Schaffer et al., 2010; Solar et al., 2009; Zhou et al., 2007). Ambos dominios se pueden delimitar mediante la detección de la expresión de distintos marcadores como la Carboxipeptidasa A1 (*Cpa1*) en el caso de los progenitores acinares localizados en los extremos, o de la Neurogenina 3 (*Ngn3*) en el caso de los progenitores endocrinos y ductales localizados en el tronco (Gu et al., 2002; Zhou et al., 2007) (Fig. 32).

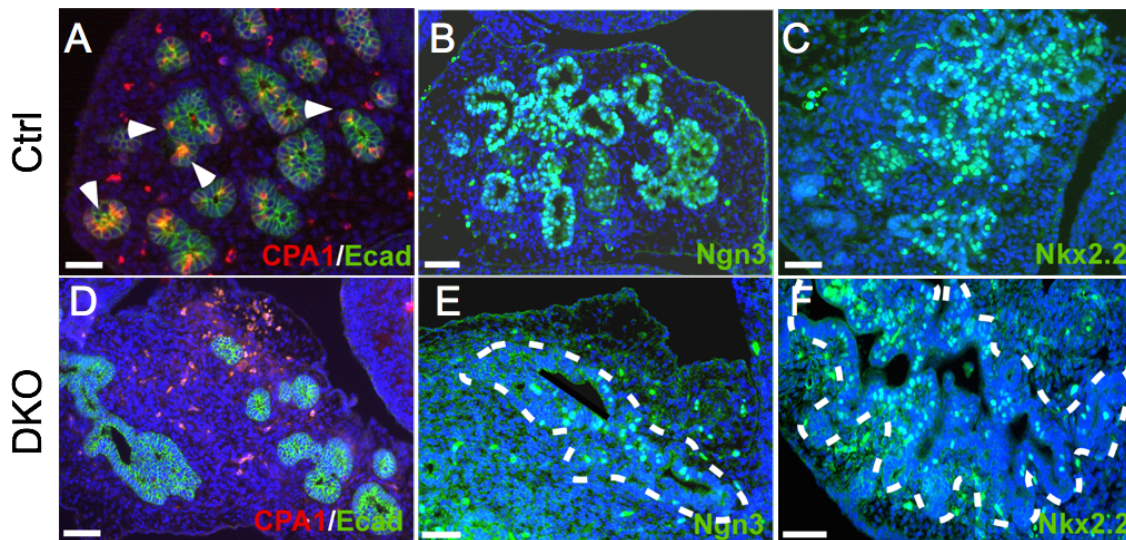


**Figura 32. Modelo del epitelio pancreático tubular en las etapas centrales del desarrollo.** Se observa un árbol epitelial ramificado, con células multipotentes en los extremos que avanzan, expandiendo y ramificando el epitelio. Las células que quedan en el tronco darán lugar a progenitores endocrinos y ductales, mientras que las de los extremos, darán lugar a células acinares. Adaptado de (Cano et al., 2014)

Mediante análisis inmunohistoquímico se analizó la expresión de CPA1 y NGN3 para determinar si la formación de los progenitores exocrinos, endocrinos y ductales estaba comprometida en los páncreas de los ratones con la doble mutación en *Gata4* y *Gata6*.

Tal y como se esperaba, en los ratones control aparecieron células positivas para CPA1 (Fig. 34, A) en los extremos del epitelio pancreático, así como células NGN3<sup>+</sup> (Fig. 34, B), precursores endocrinos y ductales localizados en el centro del árbol epitelial. Se encontró el mismo patrón en los páncreas embrionarios de ratones 4KO/6HET y 4HET/6KO.

Por el contrario, no se detectó la señal de estos marcadores al analizar los progenitores que formaban el epitelio pancreático de embriones de e13.5 *Gata4/Gata6 knockout*. Simplemente atendiendo a la morfología del epitelio pancreático, delimitado por la glucoproteína E-caderina, ya era evidente una desorganización manifiesta (Fig. 34, D). Al analizar por técnicas de inmunofluorescencia estos cortes, no se detectaron células CPA1<sup>+</sup> en los páncreas DKO (Fig. 34, D). De la misma manera, la diferenciación de células endocrinas y ductales estaba también afectada, como indicaban la escasas células positivas para NGN3 en la parte central del epitelio (Fig. 34, E). De acuerdo con esta observación, al analizar la presencia del factor de transcripción Nkx2.2, un marcador de diferenciación endocrina regulado directamente por Ngn3 (Watada et al., 2003), se observó una marcada reducción de la expresión al comparar páncreas embrionarios DKO con el control (Fig. 34, C y F).



**Figura 34. Estudio inmunohistológico de marcadores de diferenciación en páncreas embrionarios de e13.5.** El mecanismo de diferenciación hacia progenitores acinares, endocrinos y ductales está dañado en ratones *Gata4/Gata6* KO de e13.5. La enzima carboxipeptidasa 1 (Cpa1) se expresa en la población que dará lugar a células exocrinas y se localizan en los extremos del epitelio ramificado (**A**, **flechas**). En el epitelio de páncreas DKO no se localizó esta población. El marcador pro-endocrino neurogenina 3 (Ngn3) se localiza en la zona central del epitelio en ratones control (**B**). Por el contrario, se encontraron muy pocas células Ngn3<sup>+</sup> en el epitelio del embrión DKO. El marcador Nkx2.2 está también presente en esta población, y es difícilmente detectable en páncreas *Gata4/Gata6* KO (**C**, **F**). Barra de escala: 50  $\mu$ m

Estos datos indican que la diferenciación de los progenitores multipotentes del páncreas requieren la presencia de GATA4 y GATA6 para iniciar el programa de diferenciación y comprometerse hacia linajes exocrino y endocrino.

## 2.5. LA AUSENCIA DE GATA4 Y GATA6 EN RATONES AFECTA AL MANTENIMIENTO DEL *POOL* DE PROGENITORES PANCREÁTICOS

Los defectos en la proliferación y en la activación de los mecanismos de diferenciación de MPCs en ausencia de GATA4 y GATA6 podrían deberse, o estar influidos, por un defecto en la formación del *pool* de células progenitoras multipotentes del páncreas. Los factores de transcripción que se expresan en estas MPCs están bien definidos. (Zhou et al., 2007). Para poder determinar la identidad de estas células epiteliales presentes en los páncreas de embriones DKO, analizamos la expresión de estos factores de transcripción clave *Pdx1*, *Ptf1a*, *Sox9* y *Nkx6.1* (Schaffer et al., 2010), (Gu et al., 2002), (Kawaguchi et al., 2002), (Seymour et al., 2007).

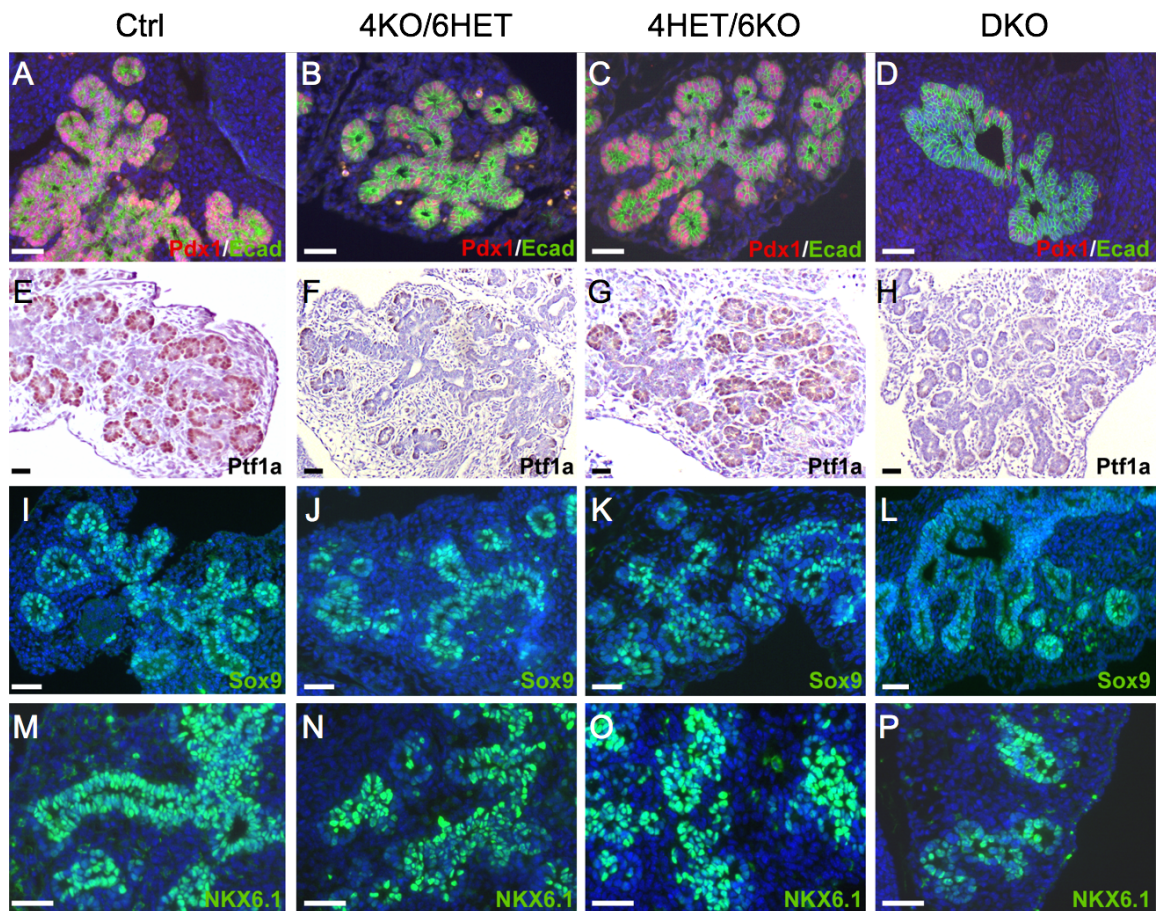
Mediante técnicas de inmunohistoquímica, utilizando anticuerpos específicos, analizamos la presencia de estos factores de transcripción en páncreas embrionarios de e13.5 de ratones control, 4KO/6HET, 4HET/6KO y DKO

Al analizar los páncreas embrionarios tanto de ratones control como de ratones 4HET/6KO la presencia de los marcadores propios de progenitores fue la que se esperaba. Los progenitores pancreáticos expresaban los marcadores *Pdx1*, *Ptf1a*, *Sox9* y *Nkx6.1* y estaban localizados a lo largo del epitelio pancreático (Fig. 35, A, C, E, G, I, K, M y O). En el caso de los páncreas de ratones 4KO/6HET, el número de células que expresaban estos marcadores estaba reducido comparados con los embriones control y 4HET/6KO (Fig. 35, B, F, J y N). La disminución en los niveles de *Pdx1* y *Ptf1a* fue especialmente significativa, lo que podría explicar los defectos en la formación del páncreas que presentaban estos ratones.

Finalmente, en el caso de los embriones DKO, el número de células epiteliales que expresaban estos marcadores, *Pdx1*, *Ptf1a*, *Sox9* y *Nkx6.1* era prácticamente nulo (Fig. 35, D, H, L y P). En el caso de los marcadores *Pdx1* y *Ptf1a*, esta disminución fue particularmente llamativa, ya que apenas unas pocas células en todo el epitelio expresaban estos factores de transcripción.

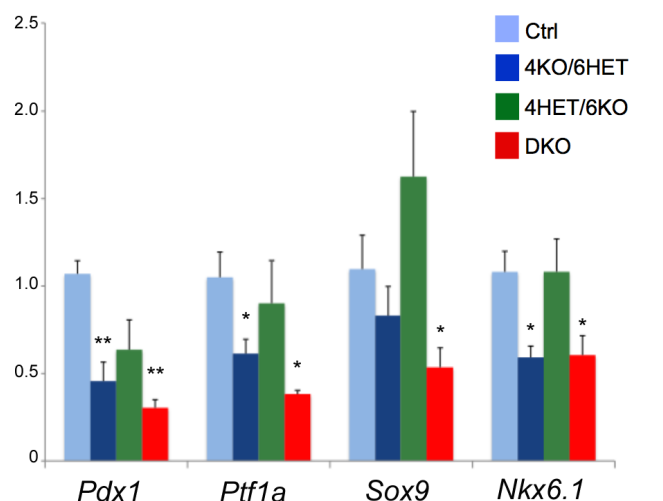
Los resultados de estas tinciones inmunohistoquímicas se vieron corroborados al analizar los niveles de ARN mensajero de estos factores de transcripción en páncreas embrionarios del e13.5 mediante PCR cuantitativa. En el caso de los páncreas de ratón DKO, los niveles de estos marcadores estaban reducidos de manera significativa, consecuencia del escasísimo número de células que los expresaban (Fig. 36). En el caso de los niveles de *Pdx1*, *Ptf1a* y *Nkx6.1* de los páncreas embrionarios de ratones 4KO/6HET también se apreció una disminución significativa, poniendo de manifiesto de nuevo el papel predominante de GATA6 en la formación del páncreas en ratón.





**Figura 35. Reducción del número de MPCs en páncreas de e13.5 de ratones *Gata4/Gata6* KO.** Los ratones control muestran una expresión coherente de los marcadores Pdx1, Ptf1a, Sox9 y Nkx6.1 (**A, E, I, M**) en el epitelio pancreático, al igual que sucede en los ratones 4HET/6KO (**C, G, K, O**). Sin embargo, en el caso de los ratones 4KO/6HET se aprecia una reducción significativa del número de células que expresan Pdx1, Ptf1a y Nkx6.1 (**B, F, N**) y en menor medida, Sox9 (**J**). La reducción del número de células positivas para estos cuatro marcadores en el caso de páncreas embrionarios de ratones DKO (**D, H, L, P**) es muy obvio. Barra de escala: 50  $\mu$ m

De este modo, el análisis de la expresión de marcadores específicos de estas células progenitoras pancreáticas indica que GATA4 y GATA6 son necesarios para la formación y el mantenimiento de este conjunto de MPCs durante el desarrollo pancreático.

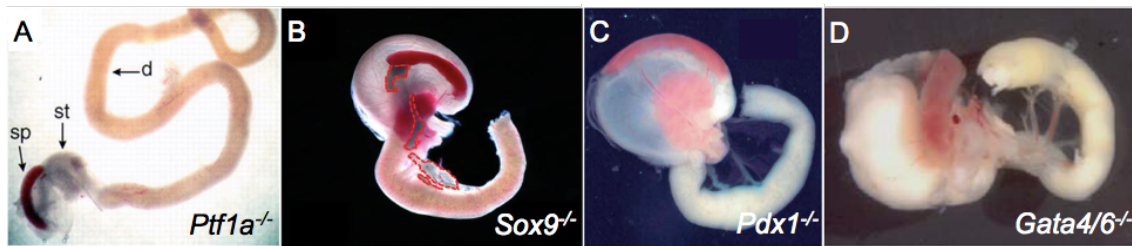


**Figura 36. Análisis de los niveles de expresión por qPCR de factores de transcripción pancreáticos en páncreas embrionarios de e13.5.** Los niveles de expresión están significativamente reducidos en el caso de los páncreas de embriones DKO con respecto al control. También se aprecia una disminución significativa en los niveles de expresión de *Pdx1* y *Ptf1a* en el caso de los páncreas de embriones 4KO/6HET. \*p value<0,02, \*\*p value<0,001.

## 2.6. LA AUSENCIA DE GATA4 Y GATA6 RECAPITULA LA AGENESIA PANCREÁTICA QUE OCURRE TRAS LA INACTIVACIÓN DE OTROS GENES CLAVES EN LA ORGANOGÉNESIS PANCREÁTICA.

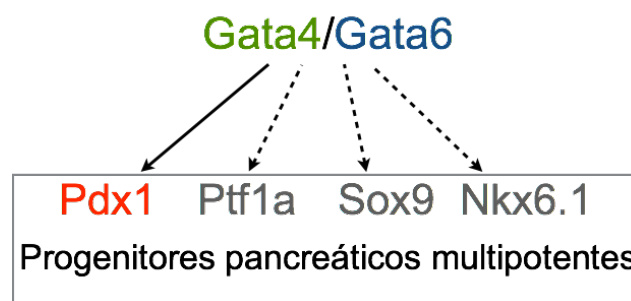
El fenotipo de agenesia pancreática ha sido descrito previamente en modelos animales mediante la inactivación de genes clave en la formación y desarrollo del páncreas. De este modo, la pérdida de función del factor de transcripción *Ptf1a* da lugar a la agenesia del páncreas, aunque durante el desarrollo se llega a formar la yema pancreática dorsal (Kawaguchi et al., 2002) (Fig. 38, A). De igual manera, ratones con deficiencias en el factor de transcripción *Sox9* nacen con una hipoplasia severa del tejido pancreático por defectos en la proliferación del *pool* de células multipotentes pancreáticas y al incremento de la muerte celular de este conjunto de progenitores (Seymour et al., 2007) (Fig. 38, B). En este caso, la ausencia de este factor también está implicada en el mantenimiento de la identidad pancreática, a través de un mecanismo mediado por factores FGF, adquiriendo estas células progenitoras un fenotipo hepático (Seymour et al., 2012). Por último, en el caso del factor de transcripción *Pdx1*, la inactivación en la línea germinal también causa agenesia pancreática. Al igual que en el caso del mutante *Ptf1a*, estos ratones también son capaces de iniciar el programa pancreático aunque el desarrollo se bloque en torno a

e10.5, indicando que *Pdx1* es necesario para el crecimiento y ramificación del epitelio pero no para la especificación pancreática. (Jonsson et al., 1994) (Fig. 38, C).



**Figura 38. Agenesia pancreática en ratones deficientes para distintos factores de transcripción implicados en el desarrollo del páncreas.** (A) Al inactivar *Ptf1a* se produce agenesia pancreática (Krapp et al., 1998). (B) Del mismo modo, la inactivación condicional de *Sox9* mediante el uso del transgén *Pdx1-Cre* da lugar a la agenesia del páncreas a e18.5 (Seymour et al., 2007). (C) En el caso del factor de transcripción *Pdx1*, su ausencia también conduce a la ausencia de masa pancreática durante el desarrollo (Jonsson et al., 1994). (D) Este fenotipo de agenesia pancreática se observa también al inactivar condicionalmente *Gata4/Gata6* en el endodermo pancreático (Carrasco et al., 2012).

Los ratones dobles mutantes para *Gata4* y *Gata6* recapitulan el fenotipo observado en ratones deficientes para estos genes, *Pdx1*, *Ptf1a* y *Sox9*, clave en el desarrollo y formación del páncreas (Fig. 38, D). Dado que los factores GATA se expresan en el endodermo prepancreático, antes de la inducción pancreática, podríamos hipotetizar que los factores GATA actúan aguas arriba de *Pdx1*, *Ptf1a*, *Sox9* y *Nkx6.1* en la red regulatoria que controla la formación temprana del páncreas (Fig. 39). Esta hipótesis se ve avalada por la observación, tal como se explica en el apartado anterior (Fig. 36), de la disminución de los niveles de estos factores en estos progenitores multipotentes pancreáticos de ratones DKO.



**Figura 39. Representación de la regulación transcripcional en los MPCs.** En ella, los factores *Gata4/6* estarían actuando aguas arriba de los factores de transcripción clave en el mantenimiento de la identidad de las células progenitoras multipotentes del páncreas. En el caso de la activación de *Pdx1*, los factores GATA activan directamente su expresión en el endodermo pancreático.

Como se verá a continuación, en el caso del factor de transcripción *Pdx1*, la activación por parte de los factores *Gata4/Gata6* es una activación directa a través de la interacción directa con área conservada en la secuencia reguladora de este gen clave en el desarrollo y formación del páncreas.

### **3 LOS FACTORES GATA4 Y GATA6 SON ACTIVADORES DIRECTOS DEL GEN *PDX1***

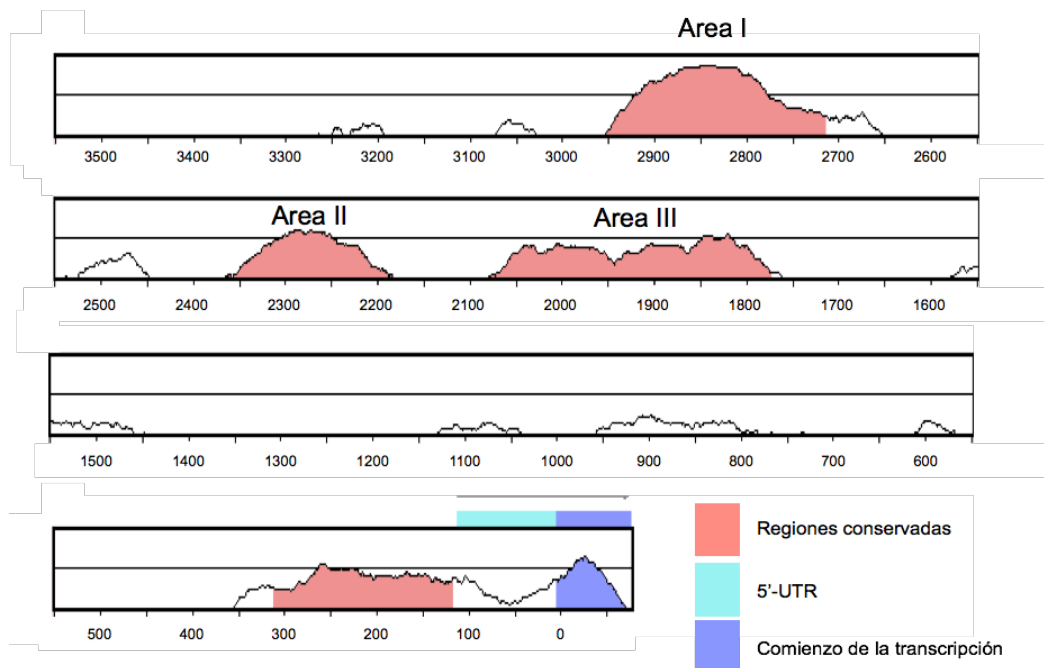
#### **3.1. REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL GEN *PDX1***

El papel clave que juega el factor de transcripción *Pdx1* en la formación y desarrollo del páncreas ha hecho se haya estudiado realmente en profundidad la regulación transcripcional que implica este factor.

En la región 5' del promotor de *Pdx1* se han encontrado varias regiones regulatorias potenciadoras o *enhancers*, que han sido identificados en la literatura como áreas I, II, III y IV (Gerrish et al., 2000; Gerrish et al., 2004). En estas áreas conservadas se unen un elevado número de factores de transcripción como HNF1a, FoxA1/2, HNF6, Pax6, MafA y Ptf1a. Todos estos factores, en algún momento del desarrollo pancreático, dirigen la expresión de *Pdx1* en los progenitores pancreáticos o en células  $\beta$  maduras (Ben-Shushan et al., 2001; Gerrish et al., 2001; Gerrish et al., 2000; Jacquemin et al., 2003; Marshak et al., 2000; Samaras et al., 2002; Samaras et al., 2003; Wiebe et al., 2007). Cada una de estas áreas de la secuencia reguladora controlan la expresión de *Pdx1* en un estadio o linaje concreto. Así, las áreas I y II se sabe que dirigen la expresión hacia células endocrinas pero no exocrinas, mientras que el área III controla la expresión en los progenitores pancreáticos (Wiebe et al., 2007).

Teniendo esto en cuenta, analizamos informáticamente las regiones conservadas del promotor de *Pdx1*, en busca de sitios de unión de factores GATA.





**Figura 40. Representación esquemática del promotor de *Pdx1*.** Las zonas en rojo representan las secuencias altamente conservadas. En ella se pueden identificar tres áreas, nombradas como áreas I, II y III. En celeste aparece la región 5'-UTR y en azul, el comienzo de la transcripción.

### **3.2. LAS SECUENCIAS REGULADORAS DEL ÁREA III DEL GEN *Pdx1* CONTIENE DOS SITIOS GATA ALTAMENTE CONSERVADOS EN MAMÍFEROS.**

Mediante el uso de herramientas bioinformáticas (*VISTA Browser*, Universidad de California) (Frazer KA, 2004) localizamos en el área III de conservación del promotor de *Pdx1* dos sitios que correspondían a la secuencia consenso de la familia GATA: WGATAR (donde W=A/T y R=A/G), o el antiparalelo YTATCW (donde Y=T/C).. Estos sitios GATA se hallaban respectivamente a 1930 y 1842 pares de bases del inicio de la transcripción y fueron nombrados como *Pdx1* G1 y G2 (Sitios GATA 1 y 2). Estos dos sitios, además de encontrarse en un área de alta conservación, presentaban una homología completa al comparar la secuencia de ratón con la de humano (Fig. 41).

<i>Pdx1</i> área III	
G1	
	* * * * *
Ratón	C G G C C A G G G T G A T A G G G T A G A G T T
Humano	C G G C C G A G G A G A T A G C A T C G A G T C
G1m	c c
G2	
	* * * * *
Ratón	C T A G G T A G A T T A T C T G T G A G G G T C
Humano	C T C G G C A G A T T A T C T C C A A G G G T C
G2m	a g a

**Figura 41. Sitios GATA G1 y G2 localizados en el área III de la secuencia reguladora de *Pdx1*.** Estos sitios aparecen resaltados en azul. Las mutaciones puntuales introducidas en los sitios GATA para generar G1m y G2m aparecen en la tercera línea, en rojo y minúsculas. Los asteriscos señalan la conservación de nucleótidos entre ratón y humano.

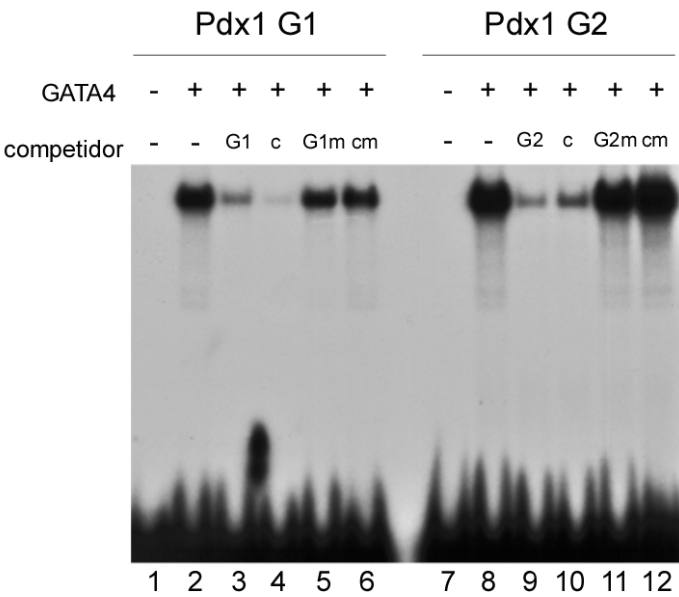
Con objeto de analizar la especificidad de estos sitios GATA y comprobar si realmente desempeñaban un papel determinante en la activación del promotor de *Pdx1* a lo largo del desarrollo embrionario, se diseñaron versiones mutadas de estos sitios GATA en las que se sustituyeron los nucleótidos originales (Fig. 41, en rojo). Estos sitios GATA mutados se nombraron como *Pdx1* G1m y G2m (Sitios GATA 1 y 2 mutados).

### 3.3. LAS PROTEÍNAS GATA4 Y GATA6 SON CAPACES DE UNIRSE EN ENSAYOS DE UNIÓN IN VITRO A LOS SITIOS *Pdx1* G1 Y G2

Dado que el fenotipo observado en los mutantes *Gata4/Gata6* se asemejaba al mutante *Pdx1*, una de las hipótesis fue la activación directa de este factor de transcripción pancreático clave por parte de los factores GATA. Para demostrar esta interacción directa, investigamos si la proteína recombinante de GATA4 y GATA6 se unía *in vitro* e *in vivo* al promotor de *Pdx1*.

Para ello, a través de un ensayo de retardo de la movilidad electroforética o EMSA (del inglés, *electrophoretic mobility shift assay*) generamos *in vitro* proteínas recombinantes de GATA4 y GATA6 y analizamos su capacidad para unirse a una

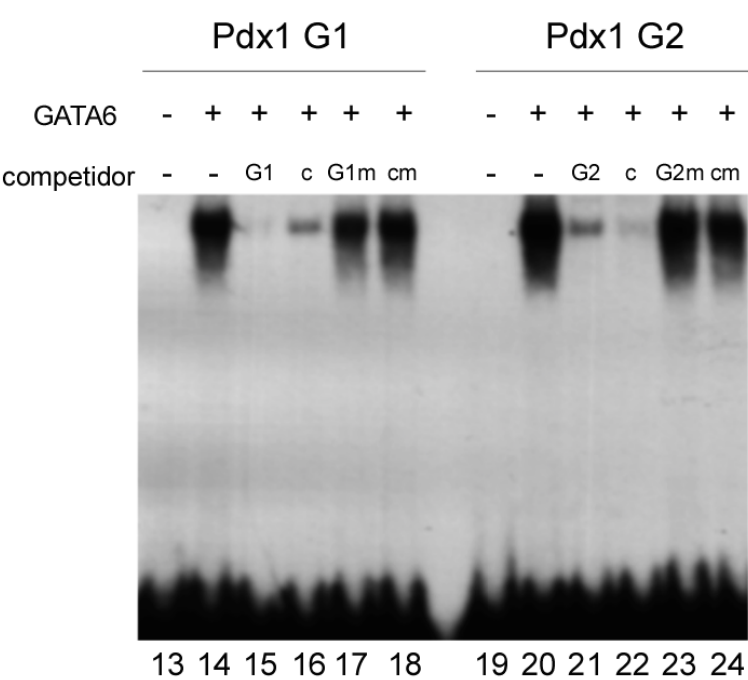
sonda de ADN que contuviese los sitios *Pdx1* G1 y G2 flanqueados por la suficiente secuencia como para permitir la interacción ADN-proteína.



**Figura 42. Ensayo de EMSA para la unión de proteína GATA4 recombinante a los sitios G1 y G2 del promotor de *Pdx1*.** Como competidores, se añadieron en exceso las sondas sin marcar radiactivamente (G1 y G2) y del sitio GATA control (c) y sus correspondientes versiones mutadas (G1m, G2m y cm).

En el caso de la proteína recombinante GATA4, generada a partir del plásmido pCI-GATA4 que codifica para la proteína de ratón y el kit *TnT Quick Coupled Transcription/Translation System* (Promega), se incubaron según el protocolo detallado en el apartado de materiales y métodos con la sonda marcada radiactivamente con  $^{32}\text{P}$  que contenía los sitios *Pdx1* G1 y *Pdx1* G2. Al correr estos complejos en una cubeta de electroforesis, la unión de GATA4 y la sonda se demuestra como un retardo en la corrida del complejo ADN-proteína (Fig. 42, líneas 2 y 8) con respecto a la sonda libre (Fig. 42, líneas 1 y 7). Para demostrar que esta unión es específica, se incubaron estos complejos con una cantidad en exceso de la propia sonda sin marcar radiactivamente (Fig. 42, líneas 3 y 9) y por un exceso de una sonda que contenía un sitio GATA control (Fig. 42, líneas 4 y 10), en las que se aprecia una unión de la proteína con la sonda no marcada, que al estar en exceso, compete con la sonda radiactiva y atenúa la banda en el ensayo. Esta competición, sin embargo, no es efectiva cuando se añaden cantidades en exceso de una sonda en la

que aparecen los sitios *Pdx1* G1 y G2 mutados (Fig. 42, líneas 5 y 11) o el sitio control para GATA mutado (Fig. 42, líneas 6 y 12), demostrando así que la unión al sitio GATA era específico. La existencia de una banda a la misma altura que la del complejo GATA4-*Pdx1* G1 y GATA4-*Pdx1* G2 indica que el factor de transcripción se une de manera preferente con la sonda que contiene estos sitios que a los competidores, a pesar de estar estos en exceso. Este ensayo también sirve para demostrar que la proteína GATA4 no es capaz de unirse a los sitios G1m y G2m ya que las mutaciones introducidas destruyen el sitio GATA verdadero.



**Figura 43. La proteína GATA6 recombinante se une en ensayos de EMSA a los sitios G1 y G2 del promotor de *Pdx1*.** Se añadió un exceso de sondas para que compitieran con la sonda marcada radiactivamente: las sondas G1 y G2 y del sitio GATA control (c) y sus correspondientes versiones mutadas (G1m, G2m y cm).

De manera análoga, al sintetizar proteína GATA6 recombinante a través del plásmido pCI-GATA6 y el kit antes referenciado se obtuvieron resultados similares. Se aprecia un retardo al incubar la proteína GATA6 junto a la sonda que contiene los sitios *Pdx1* G1 y G2 (Fig. 43, líneas 14 y 20) con respecto a la sonda que corre libre en la electroforesis (Fig. 43, líneas 13 y 19). Al añadir como competidor de la sonda marcada un exceso de la propia sonda sin marcar (Fig. 43, líneas 15 y 21) o del control para el sitio GATA (líneas 16 y 22) se observa una competición por la proteína como demuestra la drástica disminución de las bandas en esos carriles. Esta interacción

ADN-proteína es igualmente específica como se observa al añadir versiones mutadas de los sitios GATA del promotor de *Pdx1* (Fig. 43, líneas 17 y 23) o del control mutado (Fig. 43, líneas 18 y 24)

### 3.4. EXISTEN SITIOS GATA CONSERVADOS EN ÁREA I DEL PROMOTOR DE *PDX1*.

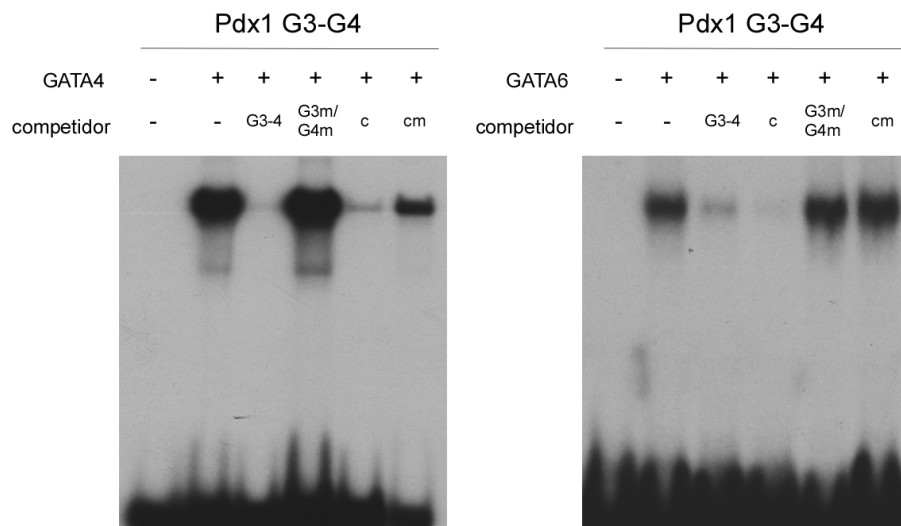
Al analizar zonas más distales de la secuencia reguladora de *Pdx1* se encontraron otros dos sitios GATA perfectamente conservados, situados en el área I del promotor de *Pdx1*, a 2787 y a 2800 pares de bases del inicio de la transcripción del gen, respectivamente. Fueron nombrados, siguiendo la nomenclatura, como *Pdx1* G3 y G4 (Fig. 44). Estos sitios, perfectamente conservados entre ratones y humanos, también se mutaron para comprobar la especificidad de los sitios en ensayos por EMSA.

*Pdx1* área I

				G4															G3																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											</
--	--	--	--	----	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	----	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	----

**Figura 44. Sitios GATA G3 y G4 localizados en el área I de la secuencia reguladora de Pdx1.** Los sitios aparecen resaltados en azul. Se introdujeron mutaciones puntuales en los sitios GATA para generar los sitios GATA mutantes G3m y G4m (en la tercera línea, en rojo y en minúsculas). Los asteriscos indican conservación de nucleótidos entre ratón y humano.

Al igual que en el caso de los sitios GATA del área III, los sitios *Pdx1* G3 y G4 eran reconocidos por proteínas GATA4 y GATA6 recombinante en ensayos de retardo (Fig. 45).



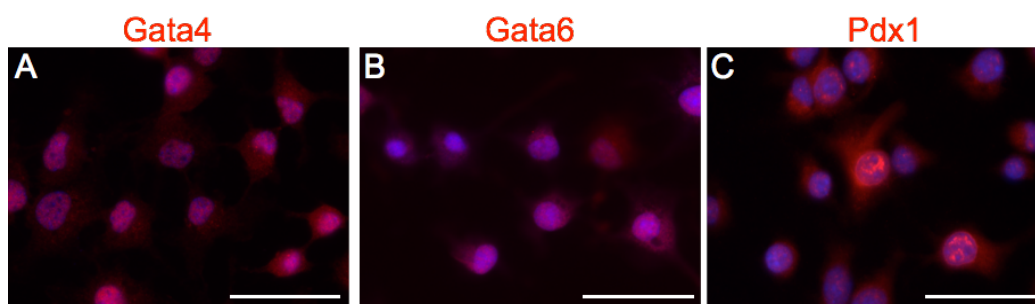
**Figura 45.** Las proteínas recombinantes GATA4 (izquierda) y GATA6 (derecha) se unen en ensayos de EMSA a sondas con los sitios G3-G4 del promotor de *Pdx1*. Al añadir en exceso competidores de la sonda marcada, no se observa marcaje radiactivo en el caso de la sonda G3-G4 sin marcar o la sonda con el sitio GATA control (c), no así en el caso de la sonda con los sitios GATA mutados (G3m-G4m) y control mutado (cm).

La presencia de estos sitios GATA conservados podrían estar contribuyendo a la regulación transcripcional de *Pdx1*, conjuntamente con los sitios *Pdx1* G1 y G2, en estadios mas avanzados del desarrollo pancreático en ratón.

### 3.5. ENSAYOS DE INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA (CHIP) EN LÍNEAS CELULARES MUESTRAN LA UNIÓN DIRECTA DE GATA4 Y GATA6 A LOS SITIOS GATA DEL ÁREA III DEL GEN *PDX1*.

Para desarrollar experimentos que demostraran la interacción de los factores de transcripción GATA4 y GATA6 con la secuencia reguladora de *Pdx1* en un contexto celular, usamos la línea celular mPAC. Estas células exhiben características fenotípicas de adenocarcinoma ductal de páncreas murino (Yoshida, 1994).

Comprobamos que la línea celular mPAC expresaba los tres factores de transcripción implicados en esta interacción transcripcional GATA4, GATA6 y PDX1 mediante la inmunodetección con anticuerpos específicos. Los tres factores se hallaron a nivel de proteína presentes en el núcleo de estas células (Fig. 46).



**Figura 46. Análisis inmunocitológico de la expresión de GATA4, GATA6 y Pdx1 en células mPAC.** Estas células mPAC expresan los factores de transcripción de la familia GATA GATA4 (A) y GATA6 (B). Igualmente, se detectó la expresión del factor Pdx1 en el núcleo (C). Barra de escala: 50  $\mu$ m.

Una vez determinado en modelo, para investigar si los factores GATA establecían una interacción directa con el área de la secuencia reguladora de *Pdx1* en la que se encontraron sitios GATA conservados, llevamos a cabo experimentos de inmunoprecipitación de cromatina o ChIP (del inglés, *Chromatine Immunoprecipitation*) en células mPACs.

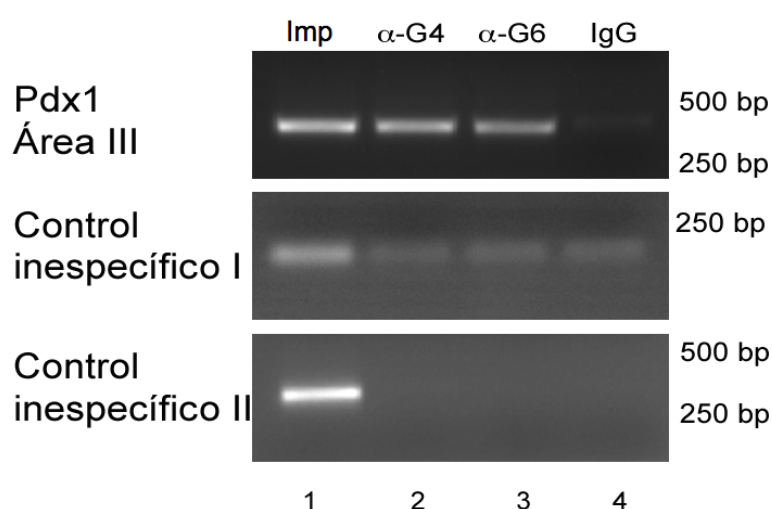
Se diseñaron tres parejas de oligonucleótidos: una que amplificara específicamente el área III del promotor de *Pdx1*, incluídos los sitios G1 y G2 y dos controles no específicos, que amplificaban áreas del genoma que no contuviesen sitios GATA conocidos. Cuando se amplificó el ADN genómico de células mPAC, previamente cortado en fragmentos de unas 100 pares de bases, aparecieron productos específicos al correr la reacción de PCR en un gel de agarosa (Fig. 47, línea 1).

Usando un anticuerpo específico que reconociese GATA4, fuimos capaces de inmunoprecipitar un fragmento que contenía los sitios *Pdx1* G1 y G2 contenidos en el área III de la secuencia reguladora. Al usar una pareja de oligonucleótidos específicos de esta zona del promotor de *Pdx1*, apareció una banda correspondiente al fragmento del área III que contenía los sitios GATA (Fig. 47, línea 2). La unión de GATA4 a los sitios G1 y G2 fue específica, ya que el producto de PCR al utilizar los primers de sitios inespecíficos no apareció ninguna banda de ADN.

De igual manera, al combinar el ADN asociado a proteínas con un anticuerpo anti-GATA6, también fue capaz de inmunoprecipitar el fragmento de ADN que posteriormente fue identificado por PCR como el fragmento del área III de la

secuencia *cis* reguladora de *Pdx1* que contiene los sitios G1 y G2. Esta prueba igualmente fue específica, ya que ninguno de los fragmentos genómicos no específicos se amplificó en la reacción de PCR (Fig. 47, línea 3).

Finalmente, al añadir una inmunoglobulina G inespecífica al complejo ADN-proteínas asociadas no resultó en la amplificación de ningún fragmento, ni del área III del promotor de *Pdx1* ni de los controles, lo que confirmó la especificidad de los anticuerpos anti-GATA4 y anti-GATA6 correspondientes (Fig. 47, línea 4).



**Figura 47. Experimento de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) realizado en células mPAC.** Los complejos ADN-proteína se incubaron con anticuerpos específicos anti-GATA4 y anti-GATA6 (líneas 2 y 3) y una inmunoglobulina G no específica (línea 4). Los anticuerpos anti-GATA4 y anti-GATA4 son capaces de amplificar la región del área III del promotor de *Pdx1* pero no las regiones de ADN genómico no específicas. En la línea 1 aparece el producto de PCR del material de partida, amplificado antes de realizar la inmunoprecipitación. A la derecha, los tamaños de los productos de PCR, en pares de base.

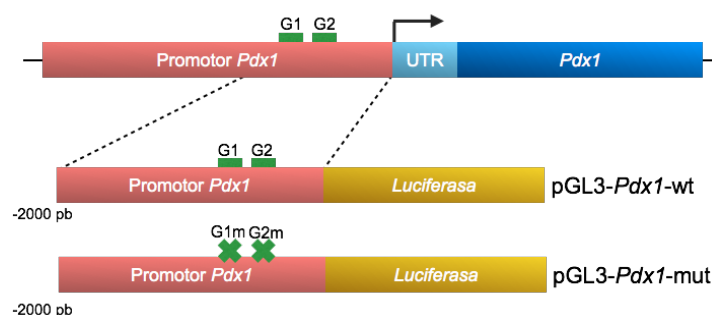
Todos estos resultados realizados en líneas celulares demuestran que los factores de transcripción GATA4 y GATA6 endógenos se encuentran unidos a los sitios GATA G1 y G2 localizados en el área III de la secuencia reguladora del gen *Pdx1*.



### 3.6. GATA4 Y GATA6 SON REGULADORES TRANSCRIPCIONALES DIRECTOS DE LA EXPRESIÓN DE *Pdx1* EN LÍNEAS CELULARES

El hecho de que GATA4 y GATA6 fueran capaces de unirse *in vitro* a las áreas conservadas de la secuencia de *Pdx1* en experimentos de EMSA y en células de la línea mPAC podrían estar indicando un posible papel de estos factores como posible reguladores transcripcionales de la expresión de *Pdx1*. Para ello, examinamos el papel de los sitios G1 y G2 en la activación del promotor de *Pdx1* en células mPAC.

Para investigar este hecho, construimos dos plásmidos que codificaban para la luciferasa, una enzima que en presencia de luciferina emite bioluminiscencia que puede ser detectada y cuantificada. Una de las construcciones, pGL3-*Pdx1*-wt, llevaba unida un fragmento con 1927 pares de bases de la secuencia reguladora de *Pdx1* (1886 pb aguas arriba y 41 pb aguas abajo del inicio de la transcripción) que contenía los sitios *Pdx1* G1 y G2 al gen de la luciferasa. De la misma manera, generamos el plásmido pGL3-*Pdx1*-mut, llevaba el mismo fragmento pero con los sitios G1 y G2 mutados (G1m y G2m) (Fig. 48). Las mutaciones introducidas fueron las mismas que en el experimento de EMSA se demostró que impedían la interacción entre los sitios GATA y las proteínas GATA4 y GATA6 (Figs. 41, 42 y 43).

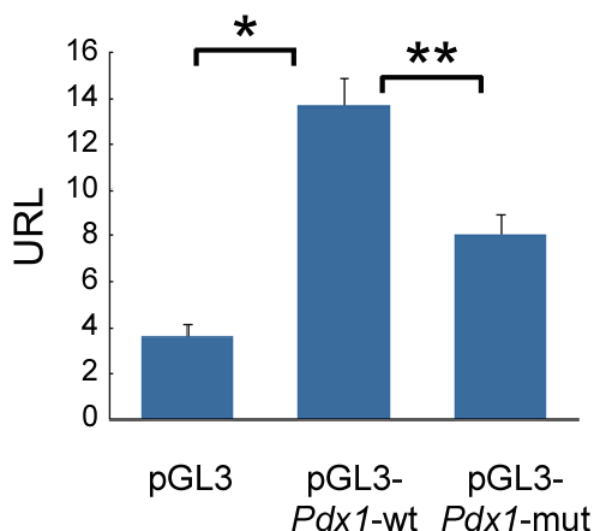


**Figura 48. Representación de las construcciones pGL3-*Pdx1*-wt y pGL3-*Pdx1*-mut.**

Para generar estas construcciones, se fusionaron unas 2000 pares de bases del promotor de *Pdx1*, incluyendo el área que contiene los sitios G1 y G2, al gen de la luciferasa en pGL3-*Pdx1*-wt. En la construcción en pGL3-*Pdx1*-mut aparecen el mismo fragmento del promotor de *Pdx1* con la versión mutada de los sitios GATA. G1m y G2m.

La actividad de la luciferasa se midió en un experimento de transfección transitoria en células mPAC. La actividad luciferasa detectada en las células transfectadas con

pGL3-*Pdx1*-wt fue significativamente mayor que en las células transfectadas con el plásmido pGL3 vacío (Fig. 49). Esto indica que los factores endógenos presentes en las células mPAC activan transcripcionalmente el promotor de *Pdx1*. Sin embargo, al transfectar células mPAC con la construcción pGL3-*Pdx1*-mut que incorporaba el promotor de *Pdx1* con los sitios G1 y G2 mutados, la activación transcripcional se vio significativamente reducida (Fig. 49).



**Figura 49. Experimento de transfecciones transitorias en células mPAC.** La construcción con la secuencia del promotor silvestre de *Pdx1* (pGL3-*Pdx1*-wt) fusionada a la luciferasa muestra una activación significativa con respecto al plásmido vacío (pGL3). Las mutaciones en los sitios GATA del promotor de *Pdx1* (pGL3-*Pdx1*-mut) reducen la actividad de la luciferasa de manera significativa. URL: unidades relativas de luz. \*p value<0,002, \*\*p value<0,005.

Esto indica que los factores GATA juegan un papel fundamental en la activación de *Pdx1* en líneas celulares pancreáticas. GATA4 y GATA6 podrían estar activando *Pdx1* en las células pancreáticas multipotentes a través de estos sitios conservados en su secuencia reguladora.

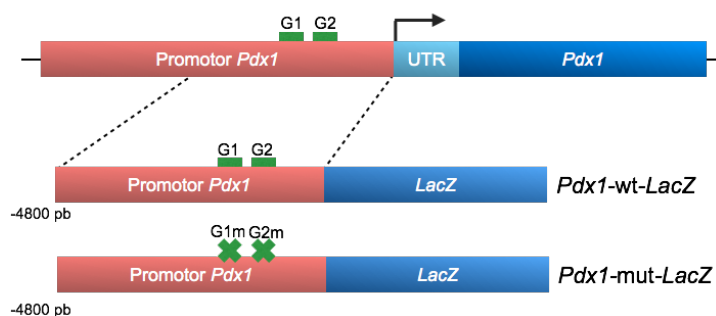
### 3.7. LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DE *PDX1* IN VIVO DEPENDE DE FACTORES GATA

Como se ha expuesto, la regulación transcripcional del gen *Pdx1* ha sido estudiada en detalle, ya que se trata de uno de los principales genes responsables del desarrollo y formación del páncreas. De esta manera, estudios previos han determinado que la región que abarca 4,6 kilobases aguas arriba del inicio de la transcripción de *Pdx1* es capaz de recapitular con fidelidad la expresión endógena de este gen durante el

desarrollo en ratones transgénicos (Gannon et al., 2001; Stoffers et al., 1999). Esta región reguladora incluye las áreas conservadas I, II y III, en las que se incluye los dos sitios GATA estudiados en esta sección de la tesis.

Para estudiar el papel que cumplen estos sitios GATA *in vivo*, generamos ratones transgénicos con una construcción que incluía las 4,6 kb de secuencia promotora de *Pdx1* fusionada al gen reportero *LacZ*. Se generaron tres líneas estables distintas de este ratón *Pdx1*-wt-*LacZ* (Fig.50).

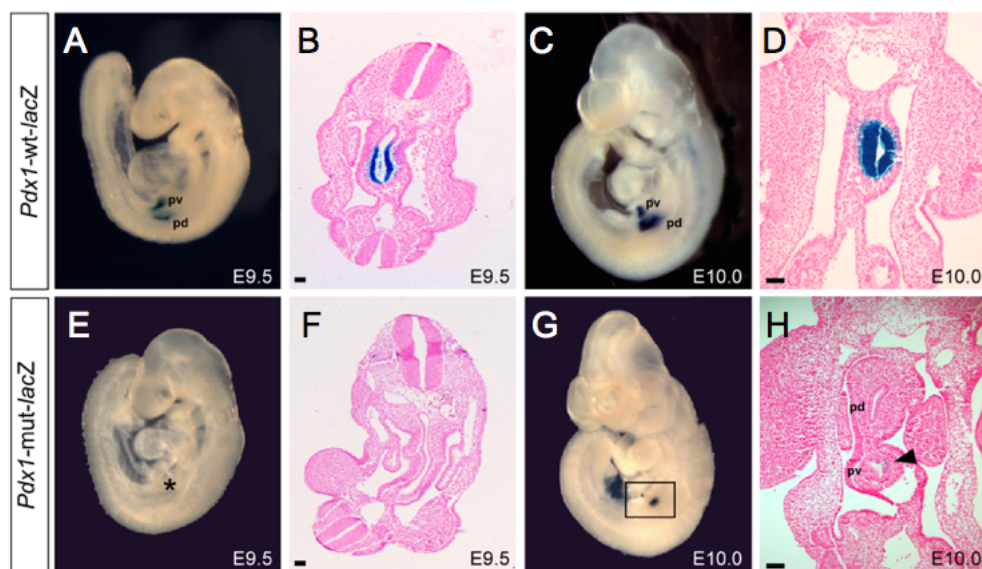
Para investigar la contribución de los sitios GATA localizados en el promotor de *Pdx1* *in vivo*, generamos otro ratón transgénico, *Pdx1*-mut-*LacZ*, en el que los sitios GATA que aparecían en el área III estaban mutados. Las mutaciones introducidas mediante PCR corresponden a la misma secuencia que los experimentos de EMSA demostraban que impedían la unión de las proteínas, y usados también en los experimentos de transfección en mPAC y que mostraban una disminución en la actividad transcripcional (Figs. 42, 43 y 49). En el caso de la construcción *Pdx1*-mut-*LacZ*, se generaron líneas estables procedentes de dos machos fundadores. Para los estudios realizados con embriones, se tuvieron en cuenta al menos 6 embriones distintos para cada una de las líneas de los distintos estadios del desarrollo.



**Figura 50. Representación de las construcciones *Pdx1*-wt-*LacZ* y *Pdx1*-mut-*LacZ*.** En ellas, 4,8 kb del promotor de *Pdx1*, incluido el área III, se fusionaron al gen reportero *LacZ*. En el transgén *Pdx1*-mut-*LacZ* se introdujeron las versiones mutadas G1m y G2m de estos sitios GATA.

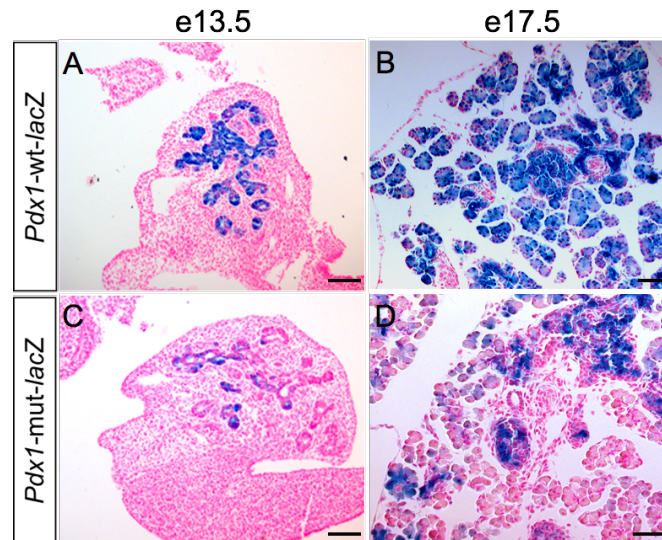
Al analizar el patrón de expresión del gen *LacZ* en los embriones que llevaban las construcción silvestre del promotor de *Pdx1*, observamos la expresión esperada. El transgén *Pdx1*-wt recapitulaba la expresión endógena de *Pdx1* de manera consistente desde los estadios tempranos del desarrollo pancreático (Fig. 51, A-D). Así, en embriones del e9.5, se podía observar la tinción positiva en las yemas

pancreáticas dorsal y ventral. Si embargo, al analizar los embriones de las líneas *Pdx1*-mut-LacZ, no se detectó la actividad del transgén en la zona media del tubo digestivo embrionario. Sólo 12 horas más tarde en el desarrollo embrionario, en embriones de e10.0, se podía observar una expresión intensa del transgén en el páncreas de embriones *Pdx1*-wt-LacZ (Fig. 51, D), mientras que en aquellos que llevaban la versión mutada de los sitios GATA, sólo se apreciaba una leve tinción en unas pocas células del primordio pancreático (Fig. 51, G, H)



**Figura 51. Análisis de la actividad  $\beta$ -galactosidasa en embriones de ratón de *Pdx1*-wt-LacZ y *Pdx1*-mut-LacZ de e9.5 y e10.0.** Embriones *Pdx1*-wt-LacZ (A, C) y *Pdx1*-mut-LacZ (E, G) teñidos con X-gal y sus correspondientes secciones transversales (B, D y F, H). Se observa actividad  $\beta$ -galactosidasa positiva en los embriones *Pdx1*-wt-LacZ a e9.5 (A, B), no así en *Pdx1*-mut-LacZ (E, F, asterisco). A e10.0, la actividad  $\beta$ -gal aparece significativamente reducida en *Pdx1*-mut-LacZ (G, H, recuadro) comparado con el embrión *Pdx1*-wt-LacZ (C, D). pv: páncreas ventral, pd: páncreas dorsal. Barra de escala: 50 $\mu$ m

A medida que avanza el desarrollo, la expresión del transgén que incorpora las 4,6 kb del promotor de *Pdx1* sigue activa en el epitelio pancreático. De esta manera, a e13.5 podemos observar todo el epitelio con tinción positiva para X-gal en los embriones *Pdx1*-wt-LacZ, mimetizando por completo la expresión endógena de *Pdx1* (Fig. 52, A). Sin embargo, en aquellos embriones que incorporan la versión mutada del área III se observa una disminución dramática en la expresión del transgén en el epitelio pancreático (Fig. 52, C). Esta circunstancia se presenta también en estadios más avanzados del desarrollo, cuando la actividad del transgén mutado se restringe sólo a unas pocas células del páncreas embrionario (Fig. 52, B y D).

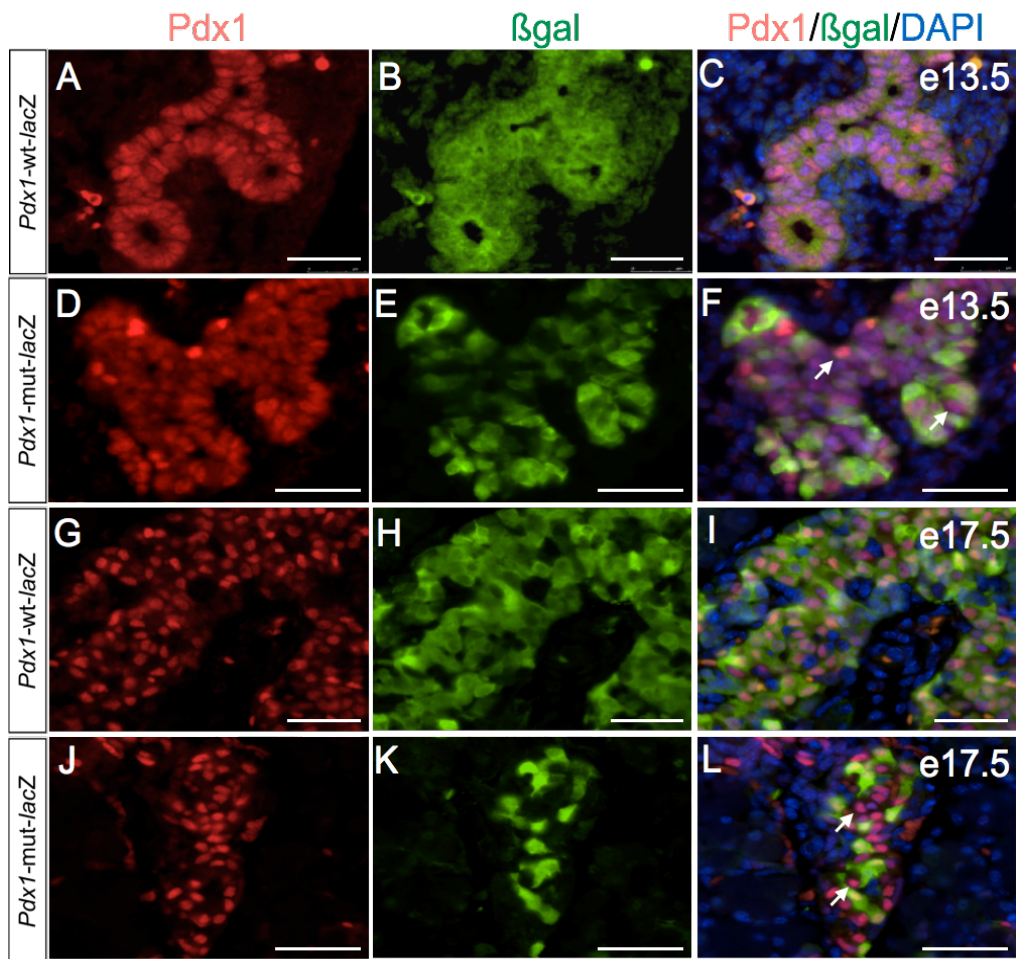


**Figura 52. Cortes histológicos representativos de embriones *Pdx1-wt-LacZ* y *Pdx1-mut-LacZ* de e13.5 y e17.5 teñidos con X-gal.** En el e13.5 todas las células del epitelio pancreático están marcadas con X-gal en el embrión *Pdx1-wt-LacZ* (A), así como en estadios posteriores en el desarrollo, a e17.5 (B). Sin embargo, los embriones *Pdx1-mut-LacZ* sólo presenta unas pocas células teñidas a e13.5 y e17.5 (C, D). Barra de escala: 50  $\mu$ m.

Esta disminución en la actividad del transgén se hace más evidente al analizar mediante ensayos de inmunohistoquímica estos páncreas embrionarios. Al teñir con anticuerpos específicos contra la enzima  $\beta$ -galactosidasa codificada por el transgén *LacZ*, se pone de manifiesto una reducción en el número de células positivas al compararlas con aquellas *Pdx1*<sup>+</sup> en páncreas embrionarios del e13.5 de la línea *Pdx1-mut-LacZ* (Fig. 53, E-F), mientras que en el caso de los embriones *Pdx1-wt-LacZ* hay un solapamiento total entre *Pdx1* endógeno y el transgén (Fig. 53, A-C). Se observa este mismo hecho en embriones del e17.5, donde en el ratón *Pdx1-mut-LacZ* presenta sólo algunas células positivas para  $\beta$ -galactosidasa en del epitelio pancreático (Fig. 53, J-L).

Estos resultados indican que los sitios GATA son necesarios para la activación transcrpcional de *Pdx1* durante el desarrollo embrionario y colocan a los factpres GATA aguas arriba de *Pdx1* en la red regulatoria que controla la formación del páncreas





**Figura 53.** El estudio por inmunofluorescencia de la expresión de la enzima  $\beta$ -galactosidasa y Pdx1 en embriones *Pdx1-wt-LacZ* y *Pdx1-mut-LacZ* a e13.5 y 17.5. Este análisis muestra un solapamiento completo de la expresión de Pdx1 y LacZ en el páncreas de *Pdx1-wt-LacZ* (A-C) mientras que sólo unas pocas células Pdx1<sup>+</sup> del páncreas de embriones *Pdx1-mut-LacZ* coexpresan  $\beta$ -gal (D-F, flechas). A medida que avanza el desarrollo, a e17.5, se observa el mismo patrón en embriones *Pdx1-wt-LacZ* (G-I) y *Pdx1-mut-LacZ* (J-L, flechas). Barra de escala: 50  $\mu$ m

## 4 LOS PROGENITORES MULTIPOTENTES PANCREÁTICOS ADQUIEREN UN FENOTIPO HEPÁTICO EN AUSENCIA DE **GATA4** Y **GATA6**

### 4.1. LA INACTIVACIÓN DE **GATA4** Y **GATA6** EN EL EPITELIO PANCREÁTICO PROVOCA LA PÉRDIDA DE IDENTIDAD PANCREÁTICA Y LA ADQUISICIÓN DE UN FENOTIPO HEPÁTICO.

Una vez demostrado que la agenesia pancreática producida por la ausencia de *Gata4/6* venía dada, en parte, por una disminución considerable de la masa de células progenitoras debido a un fallo en la proliferación y a una disminución del *pool* de progenitores pancreáticos, se presentaba la cuestión acerca de la identidad de las células presentes en el páncreas de ratones DKO.

Para analizar con detalle el perfil de expresión de estas células, realizamos un microarray con la idea de encontrar cambios significativos en las expresión de genes implicados en la proliferación y diferenciación de estas células, así como en los niveles de expresión de factores de transcripción implicados en el desarrollo pancreático. Para ello, obtuvimos 3 muestras con 3 páncreas embrionarios de e13.5 de ratones control y DKO, respectivamente.

En un primer análisis de los resultados del microarray, se confirmó la bajada de los niveles de expresión de factores de transcripción claves en el desarrollo pancreático como *Sox9*, *Pdx1* o *Nkx6.1*, que ya habían sido confirmados previamente por análisis qRT-PCR (Tabla 4).

Gen	Código	Variación de expresión	Valor estadístico ( <i>p value</i> )
<i>Pdx1</i>	NM_008814	↓3,26	0,053
<i>Sox9</i>	NM_011448	↓2,29	0,052
<i>Nkx6.1</i>	NM_144955	↓2,43	0,057

**Tabla 4. Perfil de expresión de factores de transcripción en páncreas embrionarios de e13.5 de ratones mutantes *Gata4/Gata6*.** En estos páncreas se observa una disminución significativa en los niveles de expresión de factores de transcripción clave en el desarrollo pancreático: *Pdx1*, *Sox9* y *Nkx6.1*. n=3

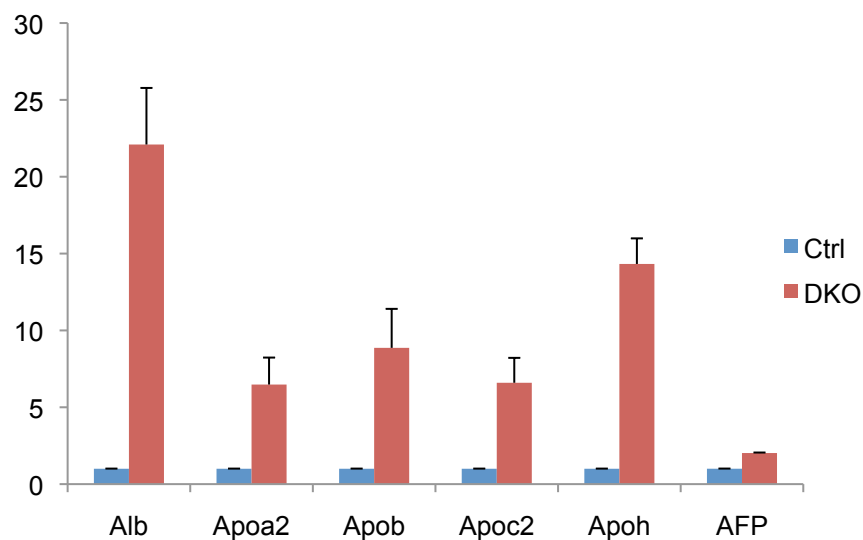
Además de esta disminución en la expresión de estos factores de transcripción, un análisis detenido del microarray desveló un aumento significativo de los niveles de expresión de genes específicos del desarrollo hepático. A pesar del origen común del hígado y del páncreas de una población bipotencial de endodermo (Bossard and Zaret, 1998), la expresión de marcadores como albúmina o ciertas apolipoproteínas son exclusivas del desarrollo hepático. En el análisis del microarray destacaron una lista de genes específicos del desarrollo hepático (Tabla 5). Curiosamente, entre los genes de esta lista aparece *Gata5*, un miembro de la familia GATA que no se expresa en el dominio pancreático en ratones silvestres, pero que en el caso de los ratones DKO aparece sobreexpresado.

Gen	Código	Variación de expresión	Valor estadístico (p value)
<i>Alb</i>	NM_009654	↑4,77	0,0252
<i>Apoa2</i>	NM_013474	↑4,43	0,0409
<i>Apoc2</i>	NM_009695	↑4,12	0,0481
<i>Apob</i>	NM_009693	↑4,02	0,0363
<i>ApoH</i>	NM_013475	↑3,98	0,0331
<i>Foxa1</i>	NM_008259	↑3,02	0,0165
<i>Foxf1a</i>	NM_010426	↑2,99	0,0395
<i>Gata5</i>	NM_008093	↑2,17	0,0032
<i>Foxp2</i>	NM_053242	↑2,04	0,0137
<i>Shh</i>	NM_009170	↑1,59	0,0474
<i>Foxh1</i>	NM_007989	↑1,54	0,0143
<i>Hlx</i>	NM_008250	↑1,44	0,0157
<i>Foxj2</i>	NM_021899	↑1,19	0,0287
<i>Cebpe</i>	NM_207131	↑1,30	0,027
<i>Mmp8</i>	NM_008611	↑1,90	0,009
<i>Pygl</i>	NM_133198	↑1,36	0,044

**Tabla 5. Perfil de expresión de genes implicados en el desarrollo hepático presentes en páncreas embrionarios de e13.5 de ratones mutantes *Gata4/Gata6*.** En estos páncreas se observa la aparición de marcadores hepáticos con valores estadísticamente significativos. n=3



Para validar los resultados del microarray, se confirmaron los resultados obtenidos mediante qRT-PCR. En ellas se muestra un aumento significativo de la expresión de los marcadores de inducción hepática, tales como Albúmina, *Apoa2*, *Apob*, *Apoc2* o *ApoH* (Fig. 54)



**Figura 54. Análisis de la expresión de marcadores hepático en epitelio pancreático e13.5.** Los marcadores hepáticos aparecieron sobrepresados en los páncreas de embriones *Gata4/Gata6 knockout* (DKO) con respecto al control (Ctrl). p value < 0,05

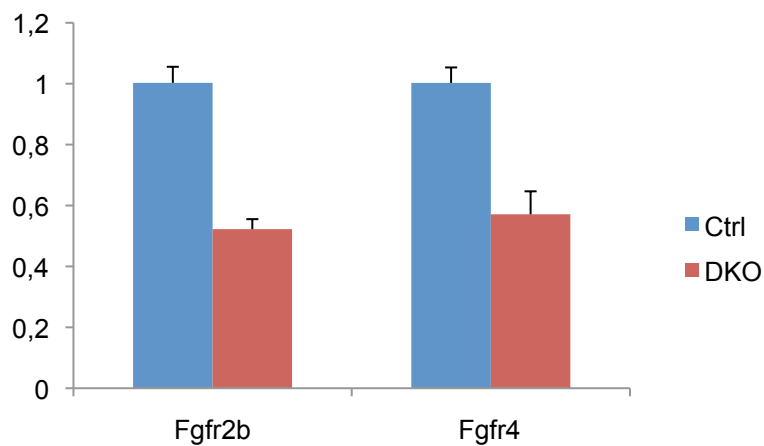
Estos resultados sugieren que en ausencia de *Gata4* y *Gata6*, las células progenitoras pancreáticas pierden su identidad y activan el programa de desarrollo hepático.

#### **4.2. LOS RATONES *GATA4/GATA6* DKO FENOCOPIAN LA CONVERSIÓN DE LINAJE PANCREÁTICO A LINAJE HEPÁTICO OBSERVADO EN LOS RATONES KNOCKOUT PARA *Sox9***

Recientemente ha sido demostrado el papel que juegan en el mantenimiento de la identidad pancreática el circuito *Sox9/Fgfr2b/Fgf10* (Seymour *et al.*, 2012). La señalización mesenquimal tiene un papel fundamental en el mantenimiento de la identidad pancreática, a través del factor Fgf10 (Bhushan A and Bellusci S, 2001). En los progenitores pancreáticos, esta señalización viene traducida básicamente por el

receptor *Fgfr2b*, lo que mantiene la expresión de *Sox9* en los progenitores pancreáticos. Del mismo modo, *Sox9* es necesario para la expresión de *Fgfr2b*, con lo que *Sox9/Fgfr2b/Fgf10* forman un circuito de retroalimentación en estos progenitores pancreáticos que mantiene su identidad. La inactivación de cualquiera de estos factores desemboca en una conversión de fenotipo de páncreas a hígado, del mismo modo que sucede en los *Gata4/Gata6 knockout*. Además, de manera muy interesante, ratones mutantes condicionales *Sox9* nacen con hipoplasia pancreática severa, debida básicamente defectos en la proliferación, supervivencia y diferenciación de los progenitores pancreáticos (Seymour et al., 2007)

Los mutantes *Sox9* presentan un aumento significativo en los niveles de expresión de marcadores hepáticos a e12.5 del mismo modo que aparecía en los mutantes *Gata4/Gata6*. También en el caso de los mutantes DKO, el análisis del microarray mostró una disminución de los niveles de receptores de Fgf, copiando igualmente el fenotipo observado en mutantes *Sox9*. Para confirmarlo, se realizaron qRT-PCR con oligonucleótidos específicos para estos receptores. Los resultados desvelaron una disminución significativa de los niveles de ARNm de estos receptores (Fig. 55).



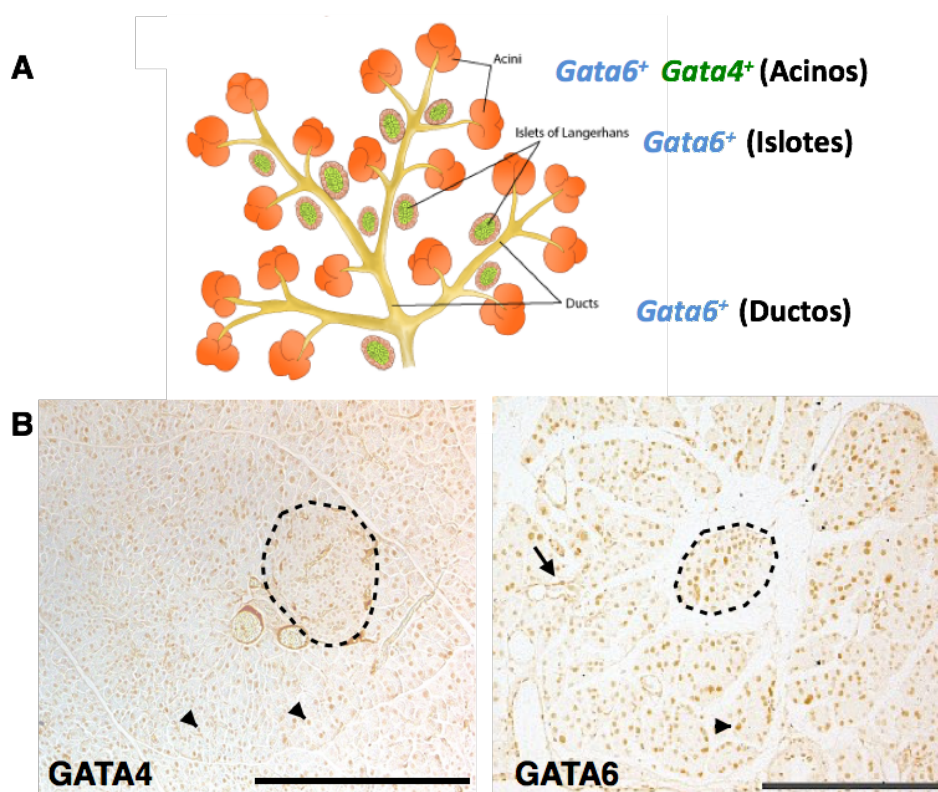
**Figura 55. Estudio de la expresión de receptores de FGF en páncreas embrionarios de e13.5.** Niveles mediante qPCR de los niveles de expresión de los receptores *Fgfr2b* y *Fgfr4* presentes en páncreas de e13.5 de ratones *Gata4/Gata6* knockout condicionales. p value < 0,05

En el caso de los ratones mutantes *Gata4/Gata6* condicionales, se produjo una disminución significativa de los niveles de expresión de *Sox9* a e13.5, tal como se explica en el apartado 2.5.

## 5 PAPEL DE LOS FACTORES **GATA** EN EL PÁNCREAS DE RATONES ADULTOS

### 5.1. PATRÓN DE EXPRESIÓN DE LOS FACTORES **GATA** EN ESTADIOS ADULTOS EN EL PÁNCREAS

Una vez que concluye la formación del páncreas en la etapa embrionaria, los factores de transcripción implicados la embriogénesis modifican su patrón de expresión. En el órgano adulto, los factores GATA se expresan en tipos celulares concretos, modificando el patrón de expresión durante el desarrollo. En ratones adultos, el factor de transcripción *Gata4* queda restringido a las células acinares del páncreas exocrino mientras que *Gata6* mantiene su expresión tanto en células endocrinas del islote de Langerhans, células acinares y células ductales (Fig. 56).



**Figura 56. Esquema del patrón de expresión de los factores GATA en ratones adultos.** (A) *Gata6* se expresa en el tejido acinar, en los islotes de Langerhans y en los ductos pancreáticos, mientras que la expresión de *Gata4* queda restringida a células acinares. (B) Secciones de páncreas adultos de ratón. La expresión de *Gata4* se observa en células acinares (cabeza de flecha), mientras que la expresión de GATA6 se detecta en el islote (línea de puntos), acinos (cabeza de flecha) y ductos (flecha). Barra de escala: 100  $\mu$ m

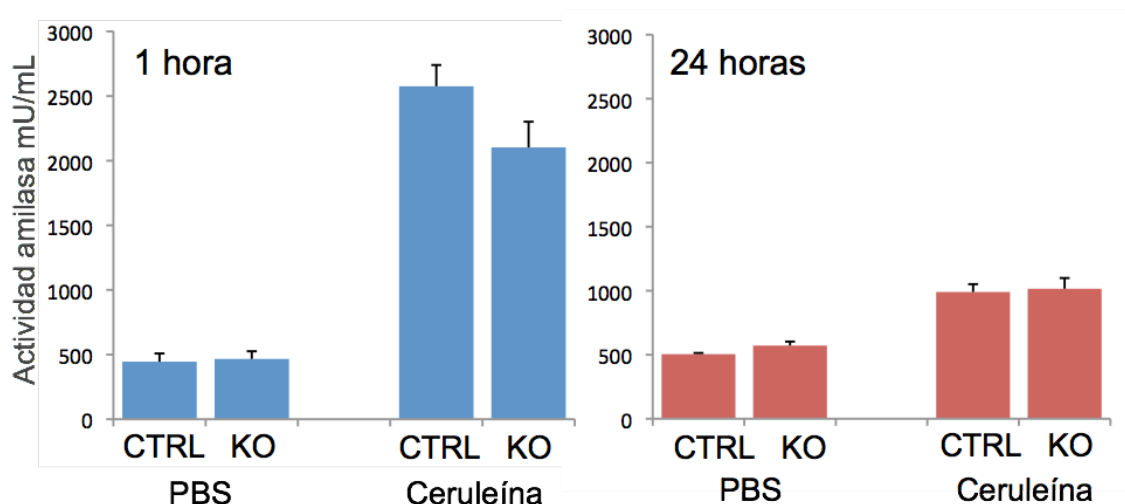
## 5.2. PAPEL DE **GATA6** EN EL PÁNCREAS EXOCRINO ADULTO

### 5.2.1. **GATA6 ES NECESARIO PARA LA REGENERACIÓN DEL TEJIDO ACINAR TRAS LA INDUCCIÓN DE PANCREATITIS MEDIADA POR TRATAMIENTO CON CERULEÍNA**

Para determinar el papel de *Gata6* en la regeneración del páncreas exocrino, se utilizó un modelo de pancreatitis inducida por la administración intraperitoneal de ceruleína. Esta droga, un análogo de la hormona intestinal colecistoquinina (CCK) produce una pancreatitis edematosa similar a la que se produce en humanos, que incluye la muerte de las células acinares, formación de edema e infiltración de células inflamatorias en el páncreas (Willemer et al., 1992),(Kim, 2008). Se utilizaron ratones *Gata6* KO jóvenes, de menos de 8 semanas para evitar el proceso de metaplasia ductal del tejido acinar descrito en *Gata6 knockout* condicionales que se instaura en ratones adultos (Martinelli et al., 2013) .

Para comprobar la correcta administración de la droga y asegurar acción de la ceruleína produciendo la pancreatitis aguda esperada, se extrajo sangre de los ratones 1 hora y 24 horas tras la última inyección y se controlaron los niveles de amilasa en el suero. La actividad amilasa una hora después de la administración de la ceruleína aumentó con respecto a los ratones a los que se les administró PBS intraperitoneal, de manera similar en los silvestres como en los *Gata6<sup>flox/flox</sup>; Pdx1-Cre*. A las 24 horas, la actividad amilasa en suero continuaba elevada, pero sin mostrar diferencias significativas entre los grupo control y *knockout* (Fig. 57).

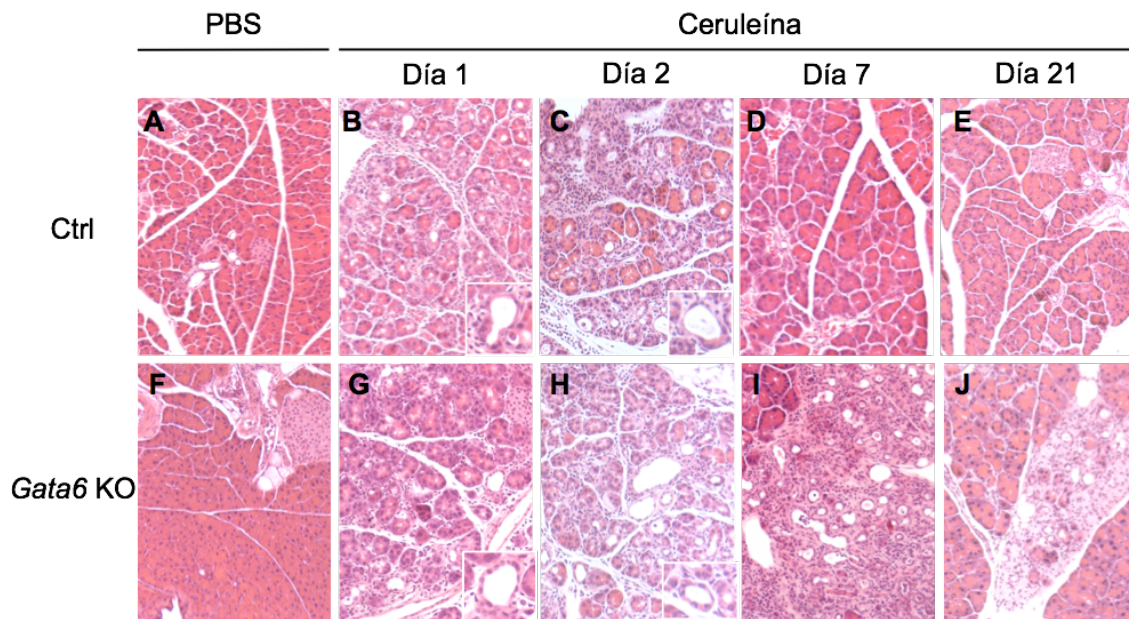
Al analizar histológicamente los páncreas, los ratones *Gata6* KO administrados con el vehículo (PBS) no mostraron ninguna evidencia de daño en el tejido acinar y no se observó diferencia alguna con respecto a los animales control (Fig. 58, A y B). Todos los animales sometidos al tratamiento con ceruleína mostraron daños en el tejido acinar en los primeros días tras el tratamiento. Las tinciones con hematoxilina y eosina de cortes histológicos de ratones sacrificados a las 24 horas de finalizar el tratamiento revelaron lesiones en el tejido acinar, tanto los ratones control como en los *Gata6* KO (Fig. 58, B y G). A las 48 horas, estas lesiones fueron incluso más evidente, y se presentaron por igual en ratones de uno y otro grupo (Fig. 58, C y H). Estas lesiones ductales metaplásicas de tipo complejos tubulares se presentan como



**Figura 57. Actividad  $\alpha$ -amilasa en el suero de ratones tratados con PBS o ceruleína vía intraperitoneal.** Una hora tras el tratamiento, la actividad amilasa se incrementó significativamente en los ratones tratados con ceruleína con respecto a los que se administraron con el vehículo (PBS). Los niveles de los animales *Gata6* KO (KO) no mostraron diferencias significativas con respecto a los ratones control (CTRL). A las 24h post-tratamiento, la actividad amilasa seguía aumentada en los ratones tratados con la droga, sin encontrar diferencias significativas entre ratones deficientes para *Gata6* y los

tubos cilíndricos con un amplio lumen delimitado por una monocapa de células tipo ductal (detalles en Fig. 58, B, C, G y H).

Sin embargo, a los 7 días tras el tratamiento, los ratones control habían conseguido regenerar la totalidad del tejido dañado por la ceruleína, mientras que en los ratones deficientes para *Gata6* continuaban apareciendo lesiones en el tejido acinar. Las lesiones se localizaban en focos del páncreas en los que la regeneración parecía bloqueada a pesar del tiempo transcurrido desde la lesión. En este caso, seguían apareciendo las lesiones tubulares, una necrosis del tejido exocrino y desorganización de la arquitectura acinar (Fig. 58, D e I). Las lesiones se mantenían incluso hasta los 21 días post tratamiento (Fig. 58, E y J).

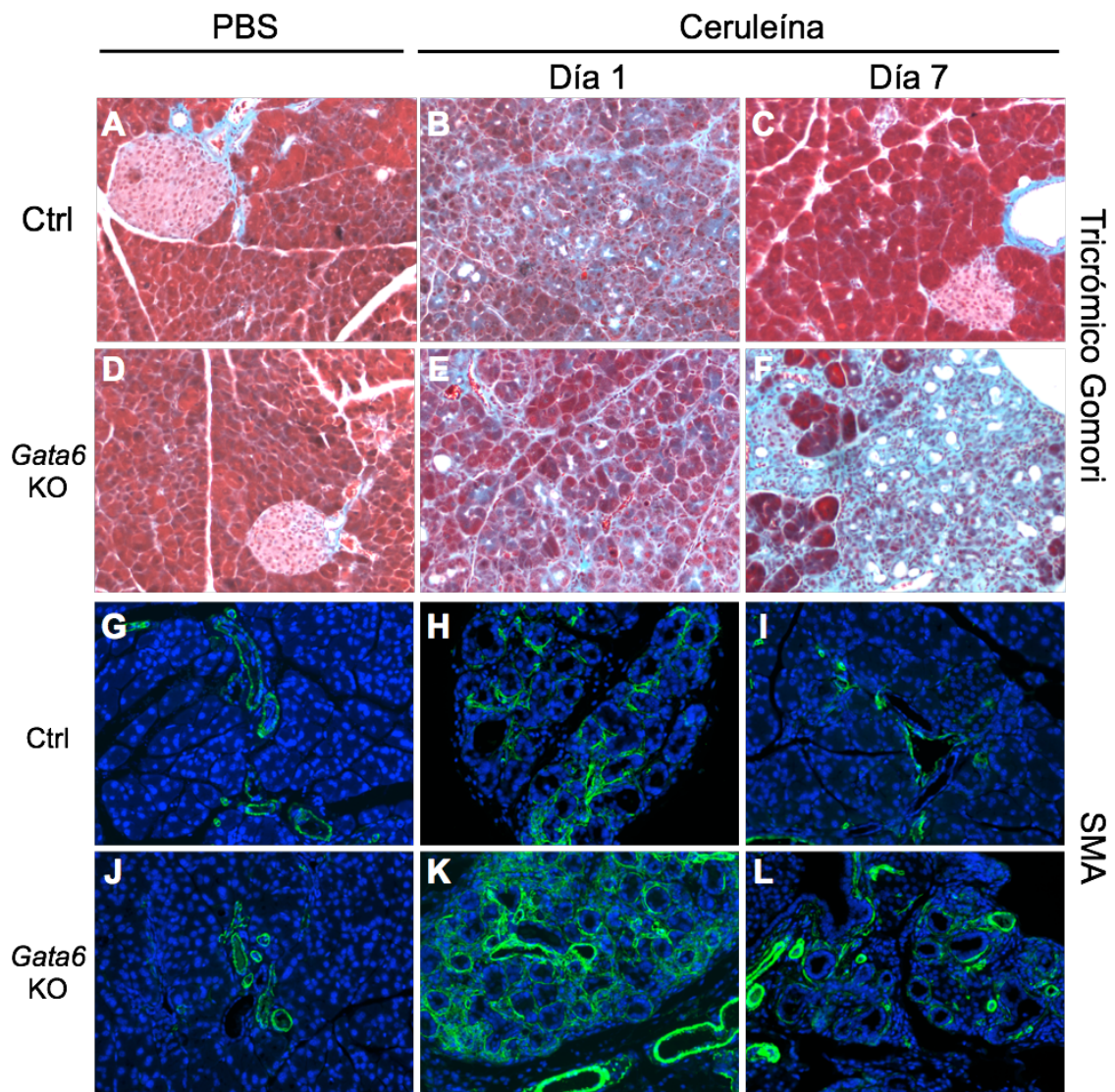


**Figura 58. Cortes histológicos representativos que muestran la morfología del páncreas durante el transcurso de la regeneración de la pancreatitis inducida por ceruleína.** Los ratones tratados con PBS (**A y F**) o con ceruleína (**B-D y G-F**) sacrificados a distintos momentos tras la administración de la droga. En las secciones **B, C, G y H** se muestran ampliadas detalles de las lesiones típicas del tipo complejo tubular. Las alteraciones morfológicas se mantienen en los ratones *Gata6* KO a los 7 y 21 días (**I, J**) tras el tratamiento, mientras que los ratones control regeneran el tejido acinar a los 7 días tras el daño (**D, E**).

Las áreas fibróticas durante la existencia del daño acumulan colágeno tal como se muestra en las tinciones de tricrómico de Gomori (Fig. 59). Las células además expresan actina del músculo liso (SMA) (Fig. 59). Sin embargo las lesiones en el caso de ratones *Gata6* KO no aparecen mas agresivas, ni hay un aumento evidente de la acumulación de proteínas de matriz extracelular.

Tal como ha sido descrito, la pancreatitis inducida por la administración de ceruleína provoca una metaplasia del tejido acinar hacia células ductales. Tras el daño provocado por la ceruleína, el tejido acinar muestra la presencia del marcador ductal Citokeratina19 (CK19) o del factor de transcripción Sox9 en tejido acinar de páncreas adultos (Fig. 60). Estudios previos también han demostrado que las células acinares sometidas a la metaplasia provocada por la pancreatitis aumentan los niveles de expresión del factor de transcripción *Pdx1*, un factor que se expresa normalmente en



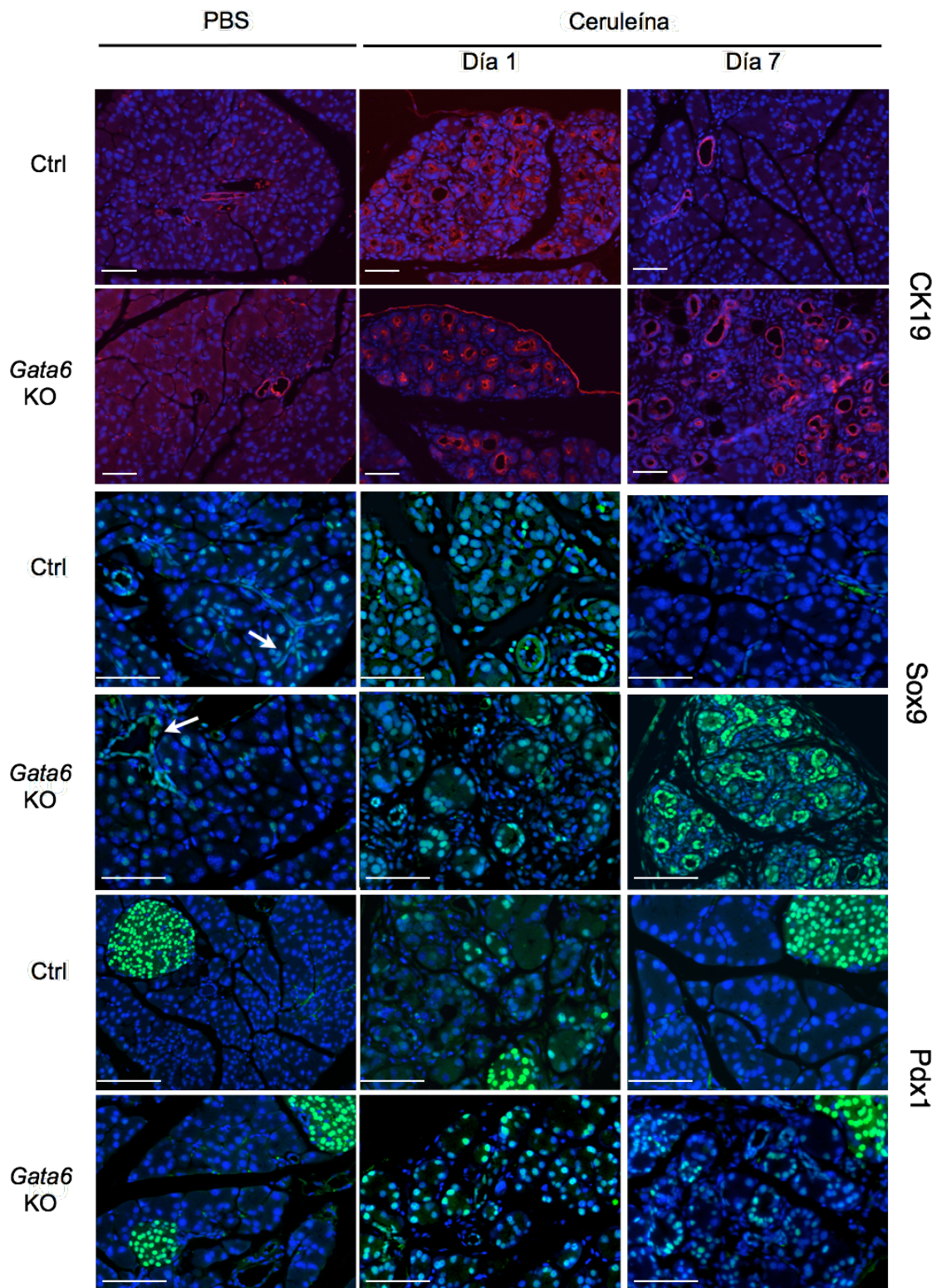


**Figura 59. Aumento de las deposiciones de proteínas de matriz extracelular en páncreas de ratones *Gata6* KO y silvestres tras inducción de pancreatitis por administración intraperitoneal de ceruleína.** Las tinciones con tricrómico de Gomori e inmunohistoquímica contra la actina del músculo liso (SMA) muestran la deposición de colágeno y actina tras la inducción de la pancreatitis a las 24 horas del tratamiento (**B, E, H, K**). Los páncreas de ratones *Gata6* KO muestran acumulación de estas proteínas tras 7 días post-tratamiento (**F, L**), comparados con el control (**C, I**).

Los progenitores pancreáticos (Jensen et al., 2005; Molero et al., 2007). Ambos fenómenos aparecen en ratones control y deficientes para *Gata6* tras la administración de la ceruleína. Sin embargo, mientras que los ratones silvestres son capaces de revertir la situación y regenerar por completo el tejido acinar, los ratones *Gata6* KO mantienen áreas en los que las metaplasias acino-ductales son evidentes (Fig. 60).



Estos resultados tomados en conjunto indican que en ausencia de GATA6, el tejido acinar de estos ratones pierde o retrasa la capacidad de regeneración tras la inducción de una pancreatitis aguda por la administración de ceruleína.

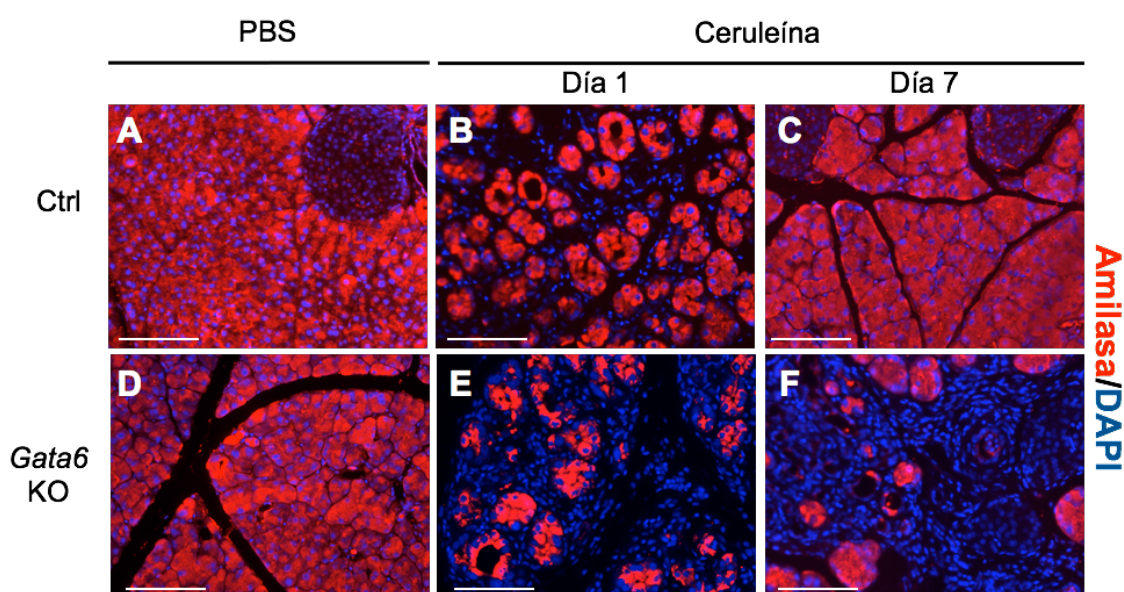


**Figura 60. Análisis inmunohistoquímico de las lesiones inducidas por la administración de ceruleína.** Secciones de ratones inyectados con solución salina (PBS) o ceruleína, estudiados a las 24h o 7 días tras el tratamiento. Las lesiones metaplásicas aparecen a las 24h, con la presencia de marcadores ductales como citokeratina 19 (CK19) y Sox9 en células acinares y la expresión de Pdx1. La presencia de estos marcadores son indetectables tras la regeneración ocurrida a los 7 días en ratones control, pero aún son evidentes en ratones *Gata6* KO. Barra de escala: 50  $\mu$ m

### 5.2.2. LOS RATONES DEFICIENTES EN GATA6 SON MÁS SUSCEPTIBLES AL DAÑO POR CERULEÍNA Y AFECTA A LA CORRECTA REGENERACIÓN DEL PÁNCREAS EXOCRINO.

La presencia de estas metaplasias en células acinares, con un incremento en la expresión de marcadores de naturaleza ductal va aparejado a una disminución de la producción de enzimas digestivas por parte del páncreas exocrino.

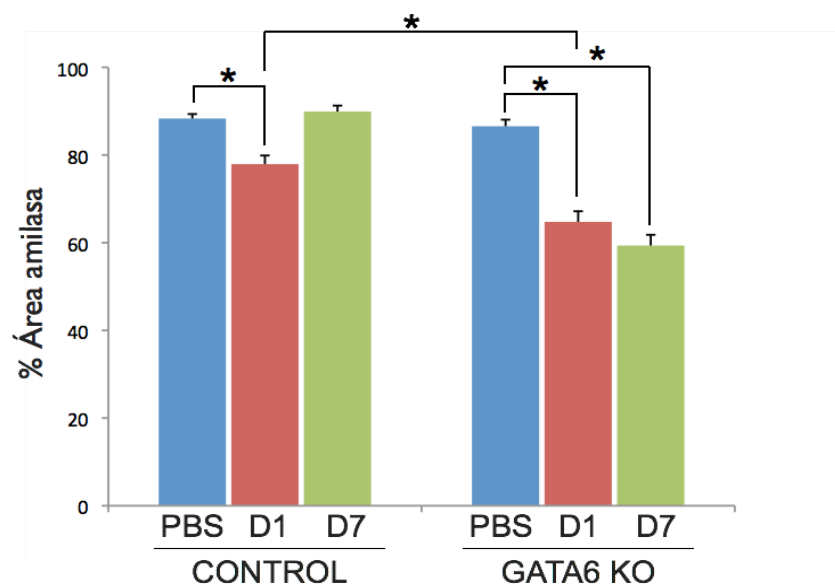
Para analizar si los ratones *Gata6* KO eran más susceptibles al daño, se realizaron, mediante análisis inmunohistoquímico, se realizaron mediciones del área de tejido exocrino compuesto por células acinares productoras de amilasa pancreática. Para ello, se llevaron a cabo tinciones con anticuerpos específicos anti-amilasa en cortes de páncreas de ratones tratados con ceruleína y solución salina (PBS). Los páncreas de ratones tratados con ceruleína mostraban a las 24 horas post tratamiento una disminución de la señal de amilasa (Fig. 61, B y E) debido a la destrucción de estas células. El proceso de regeneración lograba que a los 7 días tras la administración de la droga los ratones control regeneraran el tejido acinar dañado (Fig. 61, C) mientras que los ratones *Gata6* KO mantenían áreas dañadas (Fig. 61, F).



**Figura 61. Expresión de amilasa en secciones de páncreas de ratones control y *Gata6* KO tratados con ceruleína o PBS.** El área acinar en ratones con inyectados con ceruleína se reduce (B, E) con respecto a los ratones tratados con PBS (A, D). A los 7 días, el ratón control regenera el área dañada (C) mientras que el *Gata6* KO mantiene el daño (F). Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Barra de escala: 50µm

La cuantificación del área pancreática acinar con respecto al área total del páncreas reveló las deficiencias del ratón *Gata6* KO para regenerar el daño (Fig. 62). Así como las muestras tratadas con PBS, tanto ratones control como *knockout*, mostraban un porcentaje en torno al 90% del área total pancreática ocupada por células acinares, positivas para amilasa, a las 24 horas post tratamiento, estos niveles descendían significativamente. El efecto en la reducción del área fue más severo en el caso del ratón *Gata6* KO, en torno a un 30%, indicando que posiblemente estos ratones sean más susceptibles al daño.

A los 7 días tras el tratamiento, el área de amilasa de ratones control tratados con ceruleína es equivalente a los niveles de ratones inyectados con el vehículo, demostrando una regeneración total del tejido dañado. Sin embargo, los páncreas de ratones *Gata6* KO no consiguen recuperar el tejido dañado al producirse un bloqueo en el proceso de regeneración.



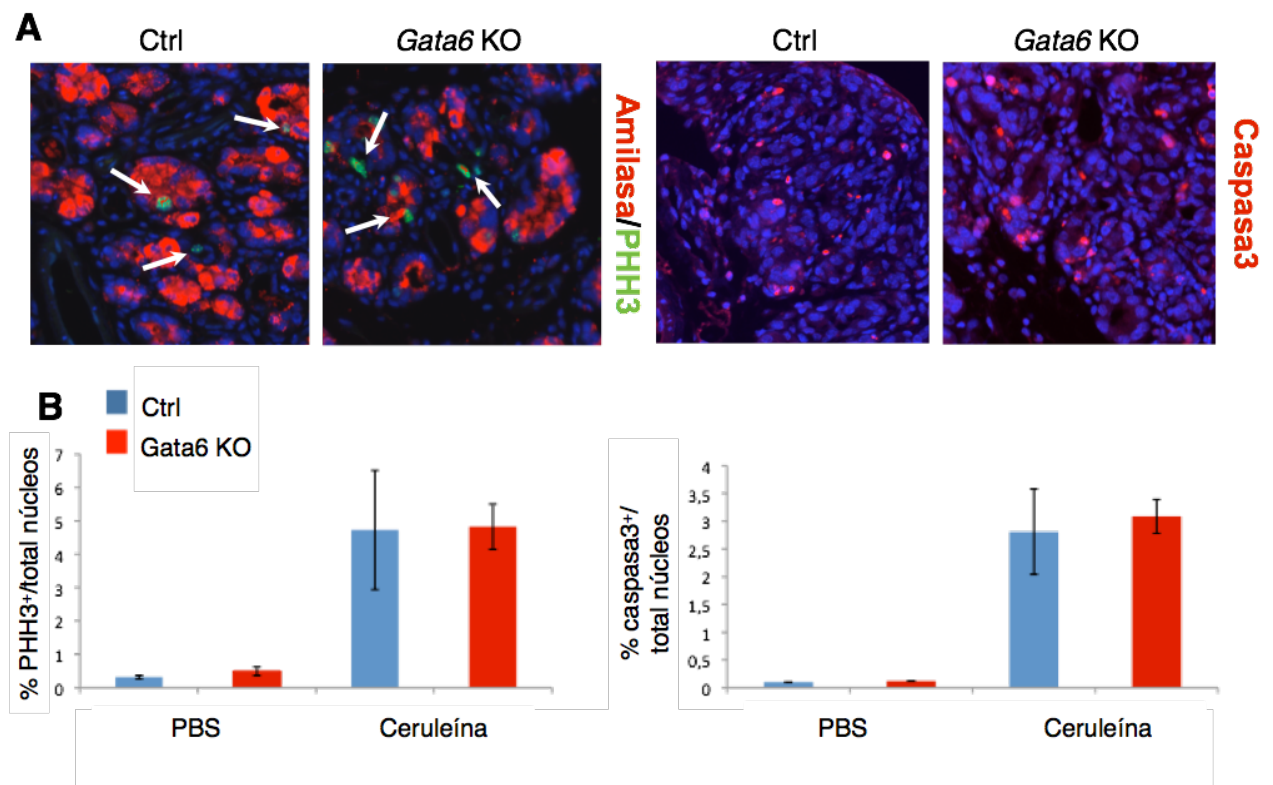
**Figura 62. Cuantificación del área productora de amilasa en páncreas de ratones control y *Gata6* KO.** Las barras representan la media del porcentaje de tejido pancreático que expresa amilasa en cada grupo. A las 24h tras la administración de la ceruleína, la disminución del área es significativamente menor en ratones control y KO. A los 7 días, los ratones control recuperan el área de tejido acinar, mientras que los ratones *Gata6* KO presentan una disminución significativa. Las barras de error representan el error estándar de la media. \*p value<0,05



### 5.2.3. EL DEFECTO DE LA REGENERACIÓN DE LOS PÁNCREAS GATA6 KNOCKOUT NO SE DEBE A FALLOS EN LA PROLIFERACIÓN NI EN LA MUERTE CELULAR.

Uno de los mecanismos a través de los cuales podría verse afectada la regeneración pudiera ser una disminución en la tasa de proliferación del tejido lesionado. Al medir esta tasa de proliferación mediante la cuantificación por imágenes de la fosforilación de la histona H3 (PHH3) tras la aparición del daño en el tejido acinar, las diferencias entre los niveles en ratones silvestres y *Gata6* KO no resultaron ser significativas, con una tasa de proliferación de alrededor del 5% del total de células exocrinas (Fig. 63).

La cuantificación de células que expresan la forma activada de la caspasa 3, en los primeros estadios del proceso de regeneración tras la administración de ceruleína determinó que la tasa de células apoptóticas en ratones *Gata6* KO y controles fue similar (Fig. 63).



**Figura 63. Estudio de la proliferación y la apoptosis en células acinares de ratones tratados con ceruleína. (A)** Secciones representativas de cortes de páncreas de ratones tratados con ceruleína. Para cuantificar la proliferación celular se contaron los núcleos que expresaban la fosfohistona H3 (PHH3) en el páncreas acinar. Para la cuantificación de la apoptosis, se relativizaron el número de células en los que se expresaba la caspasa 3 activa con respecto al número total de núcleos, marcados con DAPI. **(B)** Cuantificación de la tasa de células totales que expresaban los marcadores PHH3 y caspasa 3 activa con respecto al total de núcleos.

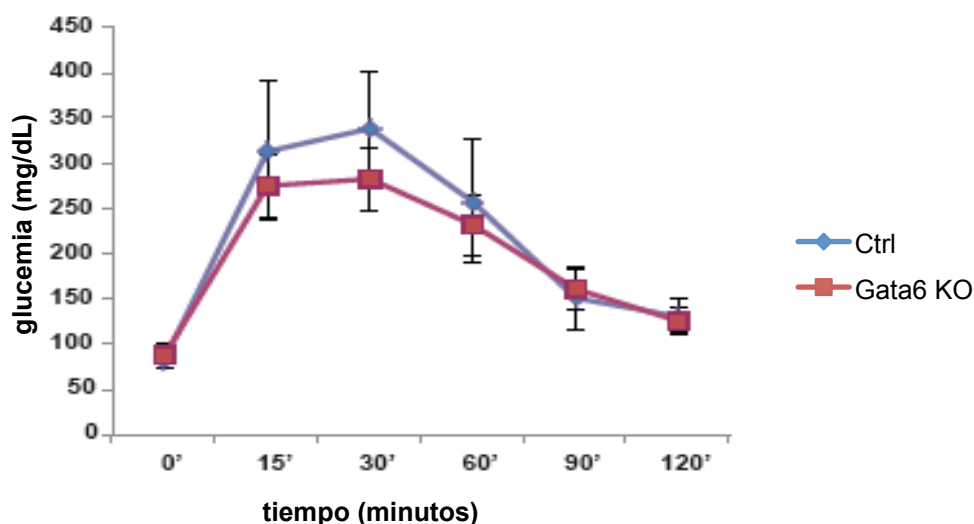
Estos resultados indican que *Gata6* no afecta a las tasas de proliferación ni apoptosis en ratones que han sufrido una pancreatitis aguda mediada por la administración de ceruleína.

### 5.3. PAPEL DE **GATA6** EN LA FUNCIÓN ENDOCRINA DEL PÁNCREAS

#### 5.3.1. LOS RATONES JÓVENES **GATA6 KO** MANTIENEN UNA HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA NORMAL.

Tal y como se ha explicado en apartados anteriores, durante el análisis de los ratones deficientes para *Gata6* no se observó ninguna deficiencia en la función endocrina. En ratones recién nacidos (P1), tanto la morfología como la histología de estos páncreas no desvelaban ningún defecto obvio. Del mismo modo, la tinción con anticuerpos específicos mostraban una distribución normal de células endocrinas en el islote pancreático.

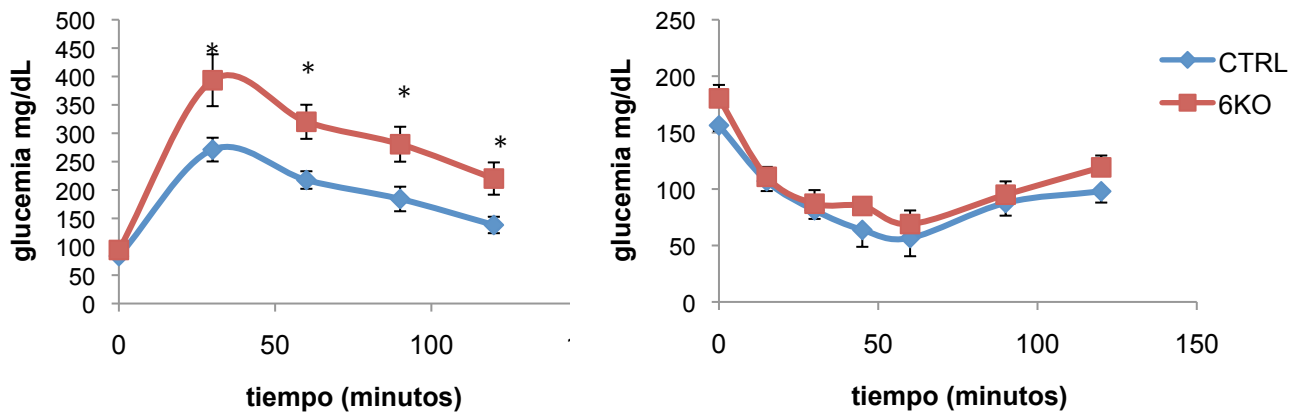
En el caso de ratones jóvenes de 5 semanas, la ausencia de **GATA6** no afectó al metabolismo de la glucosa tal y como muestran los test de tolerancia intraperitoneal de glucosa de ratones *Gata6* KO (Fig. 64)



**Figura 64. Gráfico de la curva de tolerancia a la glucosa de ratones control (Ctrl) y *Gata6* KO de 5 semanas.** La capacidad de metabolizar la glucosa en el tiempo fue similar en los ratones control (Ctrl) y *Gata6* KO.

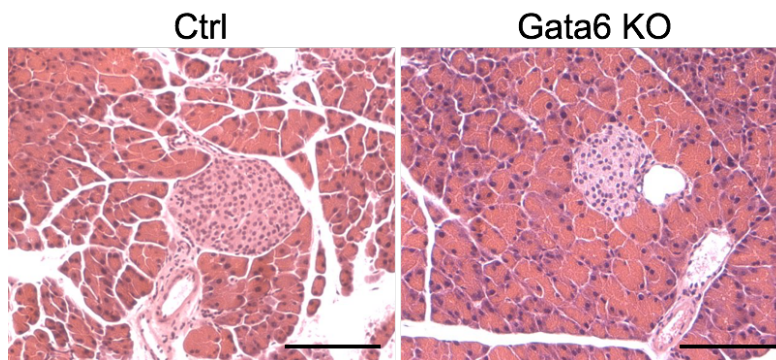
### 5.3.2. LOS RATONES DEFICIENTES **GATA6** DESARROLLAN INTOLERANCIA A LA GLUCOSA A PARTIR DE LOS 5 MESES DE EDAD

Sin embargo, a medida que estos ratones envejecen, comienzan a desarrollar intolerancia a la glucosa. Usando animales de 8 meses de edad, tras una sobrecarga intraperitoneal de glucosa, los ratones *Gata6<sup>flax/flax</sup>; Pdx1-Cre* muestran niveles alterados de glucosa en sangre al compararlos con los correspondientes controles. La glucemia basal en ayunas de estos animales no mostraba ninguna alteración. Sin embargo, la glucemia tras la sobrecarga intraperitoneal de glucosa se mantenían significativamente elevados a lo largo del ensayo (Fig. 65, A) Esta fenotipo de intolerancia a la glucosa parece ser debida a un defecto en la función de las células  $\beta$  del islote, ya que no se encontraron fallos en la sensibilidad a la insulina en ratones *Gata6*KO cuando se compararon con los controles según los resultados del test de tolerancia a la insulina (Fig. 65, B).



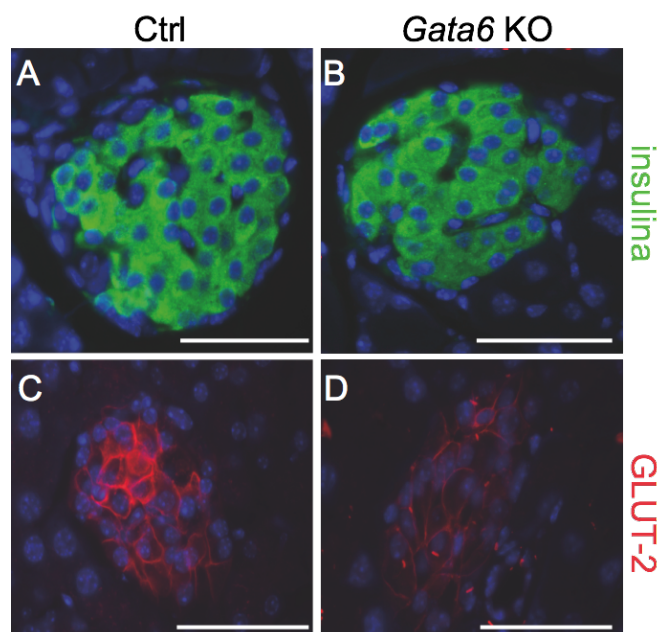
**Figura 65. Gráficos del test de tolerancia a la glucosa intraperitoneal y el test de tolerancia a la insulina en ratones *Gata6* KO adultos.** (A) El test de tolerancia intraperitoneal a la glucosa (IGTT) de ratones de 8 meses de edad muestra defectos en la asimilación de la glucosa en ratones *Gata6*KO comparados con los ratones control (Ctrl). No aparecen diferencias significativas y *Gata6*KO de 5 semanas. (B) No se aprecian diferencias significativas al realizar el test de tolerancia intraperitoneal a la insulina (IITT) en estos mismos ratones. \* p value<0,05

Así como la función de las células  $\beta$  parece que está alterada en los ratones *Gata6*KO adultos, el análisis de la arquitectura del islote no reveló ninguna defecto obvio al comparar la morfología mediante técnicas de histología con ratones control (Fig. 66).



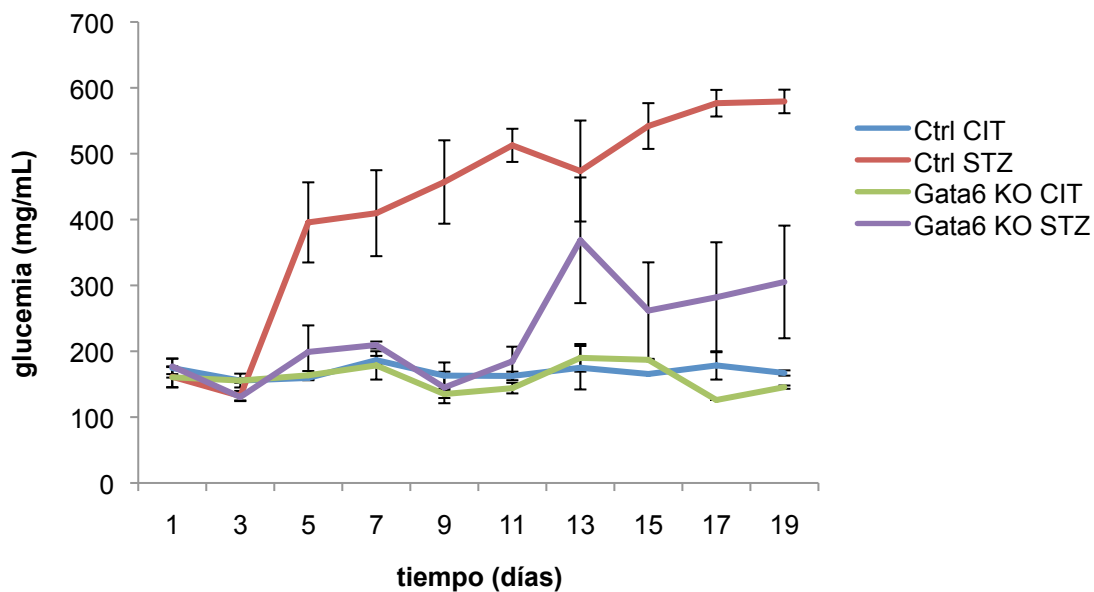
**Figura 66. Análisis histológico de los páncreas de ratones adultos *Gata6* KO.** La tinción con hematoxilina y eosina no mostró ningún defecto obvio en la arquitectura de los islotes. Barra de escala: 50  $\mu$ m

Una disminución de la masa de células beta podría ser la causante de este fallo en el control de la glucemia. Al analizar mediante inmunohistoquímica el contenido en insulina de los páncreas adultos de ratones deficientes en *Gata6* y compararlos con los respectivos controles, no apareció una disminución significativa en la señal de insulina, que fue el marcador que se utilizó para cuantificar la masa de células  $\beta$  (Fig. 67, A, B). Aunque la arquitectura del islote y la expresión de insulina en estas células parece ser normal, al analizar inmunológicamente la presencia del transportador de glucosa GLUT2, aparecieron significativamente disminuidos en los islotes deficientes en *Gata6* comparados con el control. (Fig. 67, C, D) Este hecho podría explicar, al menos en parte, los defectos de intolerancia a la glucosa en estos ratones.



**Figura 67. Análisis de los islotes de ratones *Gata6* KO y control.** Inmunofluorescencia de islotes de ratones control (Ctrl) (A, C) y *Gata6* KO (B, D). Las células  $\beta$  de los ratones *Gata6* KO expresan insulina de manera similar a los controles (A, B). Sin embargo, la expresión del transportador de glucosa GLUT-2 parece estar disminuida en el caso del islote KO con respecto al control (C, D). Barra de escala: 50  $\mu$ m

Para confirmar esta reducción en la expresión del transportador de glucosa GLUT2 en islotes de ratones *Gata6 knockout*, realizamos experimentos con estreptozotocina (McEvoy et al., 1984). La estreptozotocina (STZ) pertenece al grupo de las glucosaminas-nitrosoureas y actúa como agente alquilante. Por su analogía con la molécula de glucosa, la estreptozotocina se incorpora a las células  $\beta$  pancreáticas utilizando el propio transportador GLUT2. Al introducirse causa daños en el ADN de estas células, causando su muerte. La afinidad por el transportador GLUT2 hace que el daño sea selectivo en células  $\beta$ . formaron dos grupos control con 4 animales cada uno a los que se administró el vehículo de la droga, una solución de citrato de sodio, ratones silvestres y *Gata6 knockout* respectivamente. Los grupos tratados con STZ, control y *knockout* contaban con 4 y 5 individuos respectivamente. Los resultados muestran que los ratones *Gata6 KO* tratados con múltiples dosis de STZ a baja concentración presentan cierta resistencia al daño causado por esta droga y retrasan la aparición de la diabetes producida por la muerte de las células  $\beta$  comparados con ratones control (Fig. 68).



**Figura 68. Niveles basales de glucosa en ratones control y *Gata6 KO* tratados con estreptozotocina (STZ) o vehículo (Citrato).** Los tiempos corresponden a los días tras la administración de la STZ. \*p value<0,05





## V.DISCUSIÓN

La formación del páncreas es un proceso biológico perfectamente orquestado por un conjunto de factores de transcripción que de forma espacial y temporal controlan el programa genético para dar lugar al órgano adulto. De hecho, el papel de muchos de estos factores de transcripción es crítico en la organogénesis pancreática en el ratón, de modo que su inactivación causa defectos en la formación, que van desde la hipoplasia hasta la agenesia (Gao et al., 2008; Jonsson et al., 1994; Krapp et al., 1998; Seymour et al., 2007). En humanos, son pocos los factores de transcripción identificados hasta ahora cuyas mutaciones se han asociado a agenesia pancreática. Se han descrito mutaciones en homocigosis en las regiones codificantes de los genes *PDX1* y *PTF1A* que producen ausencia de tejido pancreático (Sellick et al., 2004; Stoffers et al., 1997).

A la corta lista de genes cuyas mutaciones producen agenesia pancreática en humanos se ha sumado el gen *GATA6*. Trabajos recientes han demostrado que mutaciones en heterocigosis en *GATA6* son la causa más común de hipoplasia y agenesia pancreática en humanos, poniendo de relieve el papel de este factor de transcripción en la formación del páncreas en humanos (Lango Allen et al.). Otros estudios también han apuntado a *GATA4* como un factor importante en el desarrollo pancreático humano, aunque con una prevalencia casi anecdótica (D'Amato et al., 2010; Shaw-Smith et al., 2014).

En concordancia con estas observaciones, esta tesis pone de manifiesto el papel fundamental que tienen los factores de transcripción GATA en la regulación transcripcional que dirige la formación del páncreas en ratones. A diferencia de lo que sucede en humanos, la inactivación individual de *Gata4* o de *Gata6* en el endodermo pancreático no afecta de manera patente a la organogénesis pancreática. Estos resultados contrastan con los resultados obtenidos de los estudios realizados en humanos, donde mutaciones en *GATA4* y especialmente en *GATA6* producen el bloqueo del desarrollo pancreático. Estas diferencias podrían ser explicadas por diferencias temporales en la inactivación génica. Mientras que en humanos las mutaciones de *GATA6* o *GATA4* ocurren en la línea germinal, la

inactivación de estos genes en nuestros modelos de ratón se produce una vez que el programa pancreático se ha iniciado. Con el fin de evitar la temprana letalidad embrionaria de los ratones *knockout* convencionales para *Gata4* o para *Gata6*, hemos inactivado condicionalmente estos genes exclusivamente en el endodermo pancreático. Para ello, utilizamos una línea de ratones transgénicos en los que la recombinasa Cre viene dirigida por la actividad del promotor de *Pdx1*, y por tanto la inducción del programa pancreático se ha iniciado. Por tanto, nuestro trabajo no nos permite determinar el papel de GATA4 y de GATA6 en la especificación pancreática. Estos estudios están limitados por la falta de líneas transgénicas Cre que permitan de manera específica y temprana la inactivación génica en el endodermo prepancreático. Quizás la línea más apropiada para este tipo de estudios es la línea *Sox17-Cre* (Liao et al., 2009), la cual dirige la expresión de la recombinasa Cre en etapas muy tempranas del endodermo definitivo. Sin embargo, y dado el amplio patrón de expresión de los factores GATA a lo largo del todo el tubo embrionario, la inactivación usando esta línea Cre, aunque temprana, no sería específica del dominio prepancreático. Los resultados que arrojan el trabajo de Xuan et al. que inactivan los factores *Gata* en el endodermo, antes de la inducción pancreática, sugieren que los factores GATA pudieran no ser esenciales para la inducción del programa pancreático. En este trabajo los autores utilizan la línea *FoxA3-Cre*, que expresa la recombinasa Cre antes del inicio del programa pancreático. La inactivación conjunta de *Gata4* y *Gata6* en el dominio de expresión de *FoxA3* no impide la formación de la yema pancreática, aunque la formación del páncreas se bloquea en estadios posteriores (Xuan et al., 2012). En nuestra experiencia, la línea transgénica *FoxA3-Cre* ha mostrado ser muy mosaica y por tanto no podemos descartar que células que escaparan de la acción de la recombinasa Cre fuesen las responsables de la formación del rudimento pancreático observado en los mutantes *Gata4/Gata6* en el endodermo prepancreático.

Las diferencias entre el fenotipo humano y murino en relación a la inactivación de GATA6 podrían explicarse también por las diferencias interespecie en cuanto al patrón de expresión de estos factores de transcripción durante el desarrollo. Los escasos trabajos que han estudiado el patrón de expresión de los factores GATA en

humanos no han determinado si existe un solapamiento espacio-temporal de GATA4 y GATA6. Esta circunstancia impide demostrar la hipótesis de que en el páncreas humano no se da la redundancia funcional observada en el desarrollo del páncreas en el ratón. En procesos tan finamente regulados como la formación del páncreas, los niveles transcripcionales de cada uno de los factores específicos en momentos puntuales del desarrollo pueden afectar a los procesos que sucedan durante ese estadio. El periodo de formación embrionaria en humanos y ratones difieren sustancialmente, de tal manera que es posible que la coincidencia espacio-temporal de GATA4 y GATA6 se produzca en el ratón y no en el humano por una cuestión de tiempo. Puede ser que debido a esto el alelo activo no sea capaz de compensar la ausencia de los demás. Por ilustrar con un ejemplo, la fase de expansión del epitelio pancreático dura unas dos semanas en humanos (CS14-CS18), mientras que en ratones este proceso sucede en apenas cuatro días (e10-e14)(Jennings et al., 2015).

Entonces, la expresión solapada de GATA4 y GATA6 en el mismo conjunto de células y al tiempo, unida al hecho de que reconozcan la misma secuencia consenso dentro de las regiones reguladoras de los genes diana, son las causas de esta redundancia funcional durante el desarrollo del páncreas. Este fenómeno no sorprende, dado que son varios los ejemplos de redundancia entre factores GATA a lo largo del desarrollo de distintos órganos derivados del mesodermo y del endodermo. En el caso del desarrollo cardíaco, GATA4 y GATA6 contribuyen de manera redundante en la diferenciación de cardiomiocitos (Zhao et al., 2008). También en el caso del desarrollo del intestino proximal, GATA4 y GATA6 existe redundancia funcional en la proliferación y diferenciación de los progenitores (Beuling et al., 2011). Al igual que ocurre en estos estudios, en el páncreas juegan un papel redundante en la proliferación, diferenciación y mantenimiento de la identidad de los progenitores pancreáticos.

El fenotipo de agenesia en los ratones *Gata4/Gata6 knockout* es la consecuencia de defectos durante el desarrollo embrionario del páncreas. En los primeros estadios del desarrollo del páncreas, durante el proceso de formación de las yemas pancreáticas dorsal y ventral y en su fusión no hay defectos evidentes en ausencia de GATA4 y

GATA6. En cambio, ya observamos defectos en estadios un poco más avanzados del desarrollo, alrededor de e13.5. Detectamos defectos obvios en cuanto a la expansión y morfología del epitelio pancreático. En este estadio también se observa una reducción en el número de progenitores debido a fallos en la proliferación. El trabajo de Xuan et al. muestra que existen defectos en proliferación incluso en estadios previos, de manera que sitúa a GATA4 y GATA6 como responsables de la expansión del primordio pancreático en los primeros estadios del desarrollo (Xuan et al., 2012). No queda del todo resuelto el mecanismo por el cual la ausencia de GATA4 y GATA6 bloquea el proceso de desarrollo del páncreas y conduce a la agenesia pancreática. Sin embargo, la disminución del número de progenitores pancreáticos en el momento de comenzar el proceso de diferenciación parece ser clave en este aspecto. En el caso de los mutantes *Gata4/Gata6*, la disminución tan pronunciada del tamaño del *pool* de células multipotentes podría imposibilitar el progreso del desarrollo y, en última instancia, ser responsable de la agenesia en recién nacidos. El papel que pudieran estar jugando estos factores GATA en la compleja red transcripcional que opera en las MPCs, junto con otros factores como Pdx1, Ptf1a y probablemente otros FT pancreáticos, podría ser clave para la obtención de unos niveles de proliferación suficientes para conseguir una masa crítica de progenitores que fueran capaces de continuar el proceso del desarrollo.

Los defectos morfológicos provocados por el fallo en la expansión y ramificación del epitelio pancreático de los embriones DKO pueden ser responsables de los defectos en la aparición de las poblaciones de precursores pro-acinares y pro-endocrino-ductales. No sorprende, por lo observado en otros linajes como en el caso de los cardiomiocitos, que los defectos en proliferación pudieran causar fallos en la activación de los programas de diferenciación a medida que avanza el desarrollo (Zhao et al., 2008). Los defectos en la ramificación y en la arquitectura tridimensional del epitelio pancreático en ratones DKO podrían estar impidiendo las señales permisivas que posibilitan el avance del desarrollo pancreático.

Otra de las consecuencias de la ausencia de GATA4 y GATA6 en estos progenitores es la pérdida de identidad pancreática. La conversión de estas células pancreáticas

hacia un linaje hepático proporciona pruebas adicionales a la ya reconocida plasticidad que existe entre tejidos del endodermo, como en los casos de transdiferenciación entre células pancreáticas, intestinales y hepáticas (Sumazaki et al., 2004). La expresión en los páncreas de ratones DKO de marcadores exclusivos del desarrollo hepático, como la albúmina, demuestra este fallo en la identidad. En los progenitores hepáticos, GATA4 es necesario para la expresión de Albúmina (Zaret, 2008), por lo que sorprende que en ausencia de GATA4 consiga activar su expresión. Quizás otro miembro de la familia, GATA5, pudiera jugar un papel en esta activación. Tal y como demuestran Seymour et al. en su trabajo, la inactivación de Sox9 también conduce a una conversión hepática de los progenitores pancreáticos (Seymour et al., 2012). Es aventurado afirmar que ambas pérdidas de identidad responden a los mismos procesos, aunque la disminución de las señales que mantienen el *loop* transcripcional *Sox9/Fgf10/Fgf2r* se observa en los páncreas DKO embrionarios.

*Gata4* y *Gata6* se expresan en un amplio número de tejidos derivados del endodermo y del mesodermo, mientras que la mayoría de los factores cuya expresión ha resultado ser determinante en la población de progenitores multipotentes del páncreas se expresa exclusivamente en el páncreas. Diferentes estudios que preceden a este trabajo demuestran la importancia de *Pdx1* y *Ptf1a* como reguladores maestros de la organogénesis pancreática (Jonsson et al., 1994; Krapp et al., 1998). Estos factores, junto a MNX1, ONECUT1, NKX6.1/2, FOXA1/2 y SOX9, a los que ahora se unen GATA4 y GATA6, forman una red transcripcional interconectada que otorga a cada uno de ellos un importante papel en los procesos que permiten el correcto desarrollo del programa pancreático.

Aunque la regulación transcripcional del gen *Pdx1* en la célula  $\beta$  está estudiada en detalle, su papel en los primeros estadios de formación del páncreas no está tan claro. Aún así, se conoce el papel de factores como Hnf6, Ptf1a, y FoxA1/A2 en la activación temprana de *Pdx1* (Gao et al., 2008; Jacquemin et al., 2003; Wiebe et al., 2007). Esta tesis añade a los factores GATA4 y GATA6 a la lista de factores de transcripción que activan a *Pdx1* durante las primeras etapas del desarrollo pancreático. Gracias a los estudios *in vivo* de animales transgénicos, hemos podido

identificar dos sitios conservados dentro de la secuencia reguladora de *Pdx1* que son activados directamente por los factores GATA. Estos sitios se localizan en el área III del promotor de *Pdx1* que dirige y controla su expresión en las primeras fases del desarrollo pancreático (Wiebe et al., 2007). En este trabajo comprobamos el papel de estos sitios en la inducción de la expresión de *Pdx1* en el primordio pancreático, así como en su mantenimiento en etapas posteriores. Sin embargo, estos sitios no son imprescindibles para que exista expresión, como indica la actividad  $\beta$ -gal observada en los ratones transgénicos *Pdx1*-mut-*LacZ*.

El análisis de los fenotipos resultantes de las distintas combinaciones de los alelos *Gata4* y *Gata6* ofrece una visión muy interesante del papel de estos factores en el desarrollo pancreático. Aunque es evidente que ambos factores son necesarios para que se forme el páncreas en ratones, GATA4 tiene una mayor capacidad para suplir a su parólogo GATA6. Los páncreas de ratones 4HET/6KO recién nacidos son completamente normales. Sin embargo, en el caso de los ratones 4KO/6HET los ratones nacen con hipoplasia pancreática y una disminución evidente de la masa acinar. Los ratones *Gata4* KO nacen sin alteraciones evidentes de la masa pancreática. El fenotipo de los ratones 4KO/6HET demuestra la importancia de la dosis alélica de este factor, ya que con una sola copia activa de *Gata6* no es capaz de llevar a cabo con éxito el programa de formación embrionaria del páncreas exocrino. Por tanto, a pesar del papel de redundancia funcional propuesto para GATA4 y GATA6, se valoran funciones distintas en el proceso de regulación transcripcional durante el desarrollo del páncreas. Éstas puedan deberse quizás a la distinta afinidad por los sitios de unión en los genes diana o a las posibles interacciones con otros factores de transcripción que funcionen como coactivadores de genes aguas abajo.

Con todo esto, los datos presentados en esta tesis demuestran el papel fundamental de los factores de transcripción GATA4 y GATA6 en la organogénesis pancreática. Los factores GATA se sitúan en la cima de la cascada transcripcional que gobierna la formación de este órgano. Este avance, junto con otros trabajos recientes, son un paso adelante en el esclarecimiento de los mecanismos que gobiernan la formación del páncreas. El conocimiento de los componentes que participan en el desarrollo



del embrión es una valiosa herramienta que nos permite recapitular este proceso *in vitro*, para su uso en la terapia celular de la diabetes. En última instancia, tendremos que ser capaces de recapitular todos los estadios que observamos en el embrión durante su desarrollo para poder generar células  $\beta$  productoras de insulina que respondan a los distintos niveles de glucemia. Y habrá que tener en cuenta todos los procesos que ocurren durante el desarrollo embrionario del páncreas, desde la inducción del endodermo definitivo, pasando por la especificación pancreática o la aparición del *pool* de células pro-endocrinas hasta la especificación de células  $\beta$  maduras. Ésta no es una tarea sencilla, pero muchos grupos de investigación están volcando sus esfuerzos en este sentido para poder desarrollar *in vitro* lo que observamos en el embrión.

Durante la maduración del páncreas, la expresión de *Gata4* se restringe a las células acinares. Por el contrario, *Gata6* está presente en células acinares células ductales y en islotes. La expresión de ambos factores en sus correspondientes compartimentos en el páncreas adulto sugieren que éstos también pudieran contribuir a la función pancreática. Esta idea se ve apoyada por los diversos trabajos realizados tanto en modelos animales como en humanos. Los resultados obtenidos tras la inactivación condicional de *Gata6* en los progenitores pancreáticos usando la línea *Ptf1a-Cre*, han mostrado que GATA6 juega un papel indispensable en el mantenimiento de la identidad acinar en ratones (Martinelli et al., 2013). El páncreas exocrino, tanto en humanos como en ratones, tiene una capacidad de regeneración muy alta en respuesta al daño pancreático. Esta regeneración se logra mediante la formación de nuevas células productoras de enzimas digestivas, a través de un proceso de inflamación, metaplasia y rediferenciación. Nuestros resultados indican que GATA6 contribuye de manera decisiva a este proceso. Los ratones *Gata6* KO no muestran una mayor susceptibilidad al daño agudo causado por la ceruleína, como muestra la actividad amilasa en el suero de estos ratones. Paradójicamente, el área productora de amilasa es menor en los ratones deficientes en GATA6. Esto podría deberse a un aumento del depósito de proteínas de la matriz extracelular que ocupa el espacio pancreático e impide la regeneración de las células acinares. La deposición de proteínas de matriz extracelular se produce como consecuencia del proceso fibrótico

que acompaña a la pancreatitis inducida por ceruleína. La mayor respuesta fibrótica de los ratones *Gata6* KO es evidente por la mayor expresión del marcador de la actina del músculo liso, indicando la activación de las células pancreáticas estrelladas que producen la matriz extracelular. Un estudio más detallado de los mecanismos moleculares a través de los cuales GATA6 participa en la regeneración pancreática nos ayudará a entender los mecanismos que controlan el proceso de iniciación, progresión y virulencia de la pancreatitis aguda. Los ratones *Gata6* KO representan un modelo útil para dicho propósito.

La contribución de GATA6 a la función endocrina del páncreas se hace patente tras el estudio en humanos, donde se ha mostrado que ciertas mutaciones en GATA6, aunque no causan defectos en el desarrollo pancreático, producen diabetes en el adulto, (Lango Allen et al.). El número creciente de casos clínicos en los que mutaciones *de novo* en GATA6 están detrás de fallos en el metabolismo de la glucosa hace presagiar que en no mucho tiempo GATA6 pasará a formar parte de la lista de genes involucrados en las diabetes tipo MODY. Nuestros resultados indican que, con apenas 12 semanas de vida, los ratones *Gata6* KO comienzan a exhibir cierta intolerancia a la glucosa que se hace evidente a medida que estos ratones envejecen. Esta intolerancia a la glucosa observada en ratones adultos puede representar un estado prediabético que preceda al desarrollo de diabetes en ratones más envejecidos. Estos análisis se están realizando actualmente en nuestro laboratorio.

La intolerancia a la glucosa observada en nuestro modelo de *knockout* condicional para *Gata6* contrasta con los resultados obtenidos en otro laboratorio usando la línea *Ptf1a-Cre*. Como se mencionó anteriormente, los ratones *Gata6<sup>flox/flox</sup>; Ptf1a-Cre* tienen defectos en el mantenimiento de la identidad acinar. Sin embargo, estos ratones no presentan ningún fenotipo endocrino y responden normalmente a altas concentraciones de glucosa. Estas discrepancias pueden explicarse por diferencias en la eficiencia de excisión de las distintas líneas *Cre*. Alternativamente, los tests de intolerancia a la glucosa en los ratones *Gata6<sup>flox/flox</sup>; Ptf1a-Cre* fueron realizados en estadios donde aún no presentan el fenotipo.

En nuestro modelo de ratón *Gata6* KO, la intolerancia a la glucosa podría ser explicada por defectos en la detección de glucosa, dada la disminución en la expresión del transportador de glucosa GLUT-2. Esto explicaría también la protección contra la diabetes inducida por estreptozotocina, molécula que se incorpora a la célula  $\beta$  a través de dicho transportador. De igual manera, existen otros elementos que acoplan la secreción de insulina en la célula  $\beta$  adulta que podrían estar afectados en estos ratones. La incapacidad para responder al aumento de la demanda de insulina a medida que estos ratones envejecen podría explicarse por una disminución de la masa de células  $\beta$  que, llegados a un cierto punto, no sea capaz de compensar la alta demanda. La generación de un ratón KO condicional para los factores GATA utilizando una línea transgénica Insulina-Cre ayudaría a descifrar el papel de estos factores específicamente en células  $\beta$ .

En conclusión, todos los resultados mostrados en esta tesis han ayudado a asentar las bases para el entendimiento del amplio espectro de patologías pancreáticas asociadas a mutaciones en los genes *GATA4* y *GATA6* en humanos, desde la agenesia pancreática hasta la diabetes postnatal o adulta con o sin insuficiencia pancreática (Decker et al., 2006; Lango Allen et al.; Shaw-Smith et al., 2014).

## VI.CONCLUSIONES

Las conclusiones de esta tesis son:

1. La inactivación individual de los genes *Gata4* o *Gata6* en el endodermo pancreático no afecta al desarrollo embrionario del páncreas en modelos de ratón *knockout* condicional.
2. La inactivación conjunta de *Gata4* y *Gata6* produce agenesia pancreática, lo que indica que en ratones estos dos factores transcripcionales son funcionalmente redundantes.
3. En ausencia de GATA4 y GATA6, las células del epitelio pancreático presentan defectos de proliferación y la expansión del árbol epitelial pancreático queda interrumpida en los estadios intermedios del desarrollo pancreático.
4. El proceso de diferenciación de los progenitores pancreáticos está bloqueado en ausencia de GATA4 y GATA6.
5. GATA4 y GATA6 son necesarios para mantener la identidad de los progenitores pancreáticos. En ausencia de estos factores se induce la expresión de marcadores hepáticos en el epitelio pancreático.
6. El área III de la secuencia reguladora del gen *Pdx1* contiene dos sitios altamente conservados en humanos y ratones. Estos sitios son reconocidos por los factores GATA4 y GATA6 en ensayos de unión *in vitro* y en experimentos de inmunoprecipitación de cromatina en la línea celular mPAC.
7. Los dos sitios de unión para factores GATA presentes en el área III del promotor de *Pdx1* son necesarios para la activación transcripcional en líneas celulares y en ratones transgénicos, lo que indica una regulación directa de *Pdx1* por factores GATA.

8. GATA6 es necesario para la correcta regeneración del páncreas exocrino tras la inducción de pancreatitis mediada por ceruleína en ratones adultos.
9. Los ratones deficientes en GATA6 desarrollan intolerancia a la glucosa a partir del quinto mes de vida, indicando un papel de este factor en el metabolismo de la glucosa.



## VII.BIBLIOGRAFÍA



Ahlgren, U., Jonsson, J., Edlund, H., 1996. The morphogenesis of the pancreatic mesenchyme is uncoupled from that of the pancreatic epithelium in IPF1/PDX1-deficient mice. *Development* 122, 1409-1416.

Ahlgren, U., Jonsson, J., Jonsson, L., Simu, K., Edlund, H., 1998. beta-cell-specific inactivation of the mouse *Ip1/Pdx1* gene results in loss of the beta-cell phenotype and maturity onset diabetes. *Genes Dev* 12, 1763-1768.

Anderson, J.P., Dodou, E., Heidt, A.B., De Val, S.J., Jaehnig, E.J., Greene, S.B., Olson, E.N., Black, B.L., 2004. HRC is a direct transcriptional target of MEF2 during cardiac, skeletal, and arterial smooth muscle development in vivo. *Mol Cell Biol* 24, 3757-3768.

Arceci, R.J., King, A.A., Simon, M.C., Orkin, S.H., Wilson, D.B., 1993. Mouse GATA-4: a retinoic acid-inducible GATA-binding transcription factor expressed in endodermally derived tissues and heart. *Mol Cell Biol* 13, 2235-2246.

Arda, H.E., Benitez, C.M., Kim, S.K., 2013. Gene regulatory networks governing pancreas development. *Dev Cell* 25, 5-13.

Ben-Shushan, E., Marshak, S., Shoshkes, M., Cerasi, E., Melloul, D., 2001. A pancreatic beta -cell-specific enhancer in the human PDX-1 gene is regulated by hepatocyte nuclear factor 3beta (HNF-3beta ), HNF-1alpha, and SPs transcription factors. *J Biol Chem* 276, 17533-17540.

Beuling, E., Baffour-Awuah, N.Y., Stapleton, K.A., Aronson, B.E., Noah, T.K., Shroyer, N.F., Duncan, S.A., Fleet, J.C., Krasinski, S.D., 2011. GATA factors regulate proliferation, differentiation, and gene expression in small intestine of mature mice. *Gastroenterology* 140, 1219-1229 e1211-1212.

Bhushan A, I.N., Kato S, Thiery JP, Czernichow P,, Bellusci S, S.R., 2001. Fgf10 is essential for maintaining the proliferative capacity of epithelial progenitor cells during early pancreatic organogenesis. *Development* 128, 5109–5117.

Bossard, P., Zaret, K.S., 1998. GATA transcription factors as potentiators of gut endoderm differentiation. *Development* 125, 4909-4917.

Bresnick, E.H., Lee, H.Y., Fujiwara, T., Johnson, K.D., Keles, S., 2010. GATA switches as developmental drivers. *J Biol Chem* 285, 31087-31093.

Bruning, J.C., Winnay, J., Bonner-Weir, S., Taylor, S.I., Accili, D., Kahn, C.R., 1997. Development of a novel polygenic model of NIDDM in mice heterozygous for IR and IRS-1 null alleles. *Cell* 88, 561-572.

Burlison, J.S., Long, Q., Fujitani, Y., Wright, C.V., Magnuson, M.A., 2008. Pdx-1 and Ptf1a concurrently determine fate specification of pancreatic multipotent progenitor cells. *Dev Biol* 316, 74-86.

Cabrera, O., Berman, D.M., Kenyon, N.S., Ricordi, C., Berggren, P.O., Caicedo, A., 2006. The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 2334-2339.

Cano, D.A., Soria, B., Martin, F., Rojas, A., 2014. Transcriptional control of mammalian pancreas organogenesis. *Cell Mol Life Sci* 71, 2383-2402.

Capito, C., Simon, M.T., Aiello, V., Clark, A., Aigrain, Y., Ravassard, P., Scharfmann, R., 2013. Mouse muscle as an ectopic permissive site for human pancreatic development. *Diabetes* 62, 3479-3487.

Carrasco, M., Delgado, I., Soria, B., Martin, F., Rojas, A., 2012. GATA4 and GATA6 control mouse pancreas organogenesis. *J Clin Invest* 122, 3504-3515.

Cebola, I., Rodriguez-Segui, S.A., Cho, C.H., Bessa, J., Rovira, M., Luengo, M., Chhatriwala, M., Berry, A., Ponsa-Cobas, J., Maestro, M.A., Jennings, R.E., Pasquali, L.,

Moran, I., Castro, N., Hanley, N.A., Gomez-Skarmeta, J.L., Vallier, L., Ferrer, J., 2015. TEAD and YAP regulate the enhancer network of human embryonic pancreatic progenitors. *Nat Cell Biol* 17, 615-626.

Chiang, M.K., Melton, D.A., 2003. Single-cell transcript analysis of pancreas development. *Dev Cell* 4, 383-393.

Coffinier, C., Thepot, D., Babinet, C., Yaniv, M., Barra, J., 1999. Essential role for the homeoprotein vHNF1/HNF1beta in visceral endoderm differentiation. *Development* 126, 4785-4794.

Collombat, P., Hecksher-Sorensen, J., Krull, J., Berger, J., Riedel, D., Herrera, P.L., Serup, P., Mansouri, A., 2007. Embryonic endocrine pancreas and mature beta cells acquire alpha and PP cell phenotypes upon Arx misexpression. *J Clin Invest* 117, 961-970.

Collombat, P., Mansouri, A., Hecksher-Sorensen, J., Serup, P., Krull, J., Gradwohl, G., Gruss, P., 2003. Opposing actions of Arx and Pax4 in endocrine pancreas development. *Genes Dev* 17, 2591-2603.

Collombat, P., Xu, X., Ravassard, P., Sosa-Pineda, B., Dussaud, S., Billestrup, N., Madsen, O.D., Serup, P., Heimberg, H., Mansouri, A., 2009. The ectopic expression of Pax4 in the mouse pancreas converts progenitor cells into alpha and subsequently beta cells. *Cell* 138, 449-462.

D'Amato, E., Giacomelli, F., Giannattasio, A., D'Annunzio, G., Bocciardi, R., Musso, M., Lorini, R., Ravazzolo, R., 2010. Genetic investigation in an Italian child with an unusual association of atrial septal defect, attributable to a new familial GATA4 gene mutation, and neonatal diabetes due to pancreatic agenesis. *Diabet Med* 27, 1195-1200.

De Franco, E., Shaw-Smith, C., Flanagan, S.E., Shepherd, M.H., Hattersley, A.T., Ellard, S., 2013. GATA6 mutations cause a broad phenotypic spectrum of diabetes from pancreatic agenesis to adult-onset diabetes without exocrine insufficiency. *Diabetes* 62, 993-997.

De Vas, M.G., Kopp, J.L., Heliot, C., Sander, M., Cereghini, S., Haumaitre, C., 2015. Hnf1b controls pancreas morphogenesis and the generation of Ngn3+ endocrine progenitors. *Development* 142, 871-882.

Decker, K., Goldman, D.C., Grash, C.L., Sussel, L., 2006. Gata6 is an important regulator of mouse pancreas development. *Dev Biol* 298, 415-429.

Deutsch, G., Jung, J., Zheng, M., Lora, J., Zaret, K.S., 2001. A bipotential precursor population for pancreas and liver within the embryonic endoderm. *Development* 128, 871-881.

Dodou, E., Xu, S.M., Black, B.L., 2003. mef2c is activated directly by myogenic basic helix-loop-helix proteins during skeletal muscle development in vivo. *Mech Dev* 120, 1021-1032.

Edward J. Richards, W.K., Mokenge Malafa, Jin Q. Cheng, Domenico Coppola, 2013. Molecular Diagnostics of Pancreatic Cancer, Molecular Pathology and Diagnostics of Cancer, pp. 259-282.

Ejarque, M., Cervantes, S., Pujadas, G., Tutusaus, A., Sanchez, L., Gasa, R., 2013. Neurogenin3 cooperates with Foxa2 to autoactivate its own expression. *J Biol Chem* 288, 11705-11717.

Esni, F., Ghosh, B., Biankin, A.V., Lin, J.W., Albert, M.A., Yu, X., MacDonald, R.J., Civin, C.I., Real, F.X., Pack, M.A., Ball, D.W., Leach, S.D., 2004. Notch inhibits Ptf1 function and acinar cell differentiation in developing mouse and zebrafish pancreas. *Development* 131, 4213-4224.

Frazer KA, P.L., Poliakov A, Rubin EM, Dubchak I., 2004. VISTA: computational tools for comparative genomics. *Nucleic Acids Res.* Jul 1;32 (Web Server issue):W273-9.

Frossard, J.L., Hadengue, A., Pastor, C.M., 2001. New serum markers for the detection of severe acute pancreatitis in humans. *Am J Respir Crit Care Med* 164, 162-170.

Gannon, M., Ables, E.T., Crawford, L., Lowe, D., Offield, M.F., Magnuson, M.A., Wright, C.V., 2008. pdx-1 function is specifically required in embryonic beta cells to generate appropriate numbers of endocrine cell types and maintain glucose homeostasis. *Dev Biol* 314, 406-417.

Gannon, M., Gamer, L.W., Wright, C.V., 2001. Regulatory regions driving developmental and tissue-specific expression of the essential pancreatic gene pdx1. *Dev Biol* 238, 185-201.

Gannon, M., Herrera, P.L., Wright, C.V., 2000. Mosaic Cre-mediated recombination in pancreas using the pdx-1 enhancer/promoter. *Genesis* 26, 143-144.

Gao, N., LeLay, J., Vatamaniuk, M.Z., Rieck, S., Friedman, J.R., Kaestner, K.H., 2008. Dynamic regulation of Pdx1 enhancers by Foxa1 and Foxa2 is essential for pancreas development. *Genes Dev* 22, 3435-3448.

Garg, V., Kathiriyia, I.S., Barnes, R., Schluterman, M.K., King, I.N., Butler, C.A., Rothrock, C.R., Eapen, R.S., Hirayama-Yamada, K., Joo, K., Matsuoka, R., Cohen, J.C., Srivastava, D., 2003. GATA4 mutations cause human congenital heart defects and reveal an interaction with TBX5. *Nature* 424, 443-447.

Gasa, R., Mrejen, C., Leachman, N., Otten, M., Barnes, M., Wang, J., Chakrabarti, S., Mirmira, R., German, M., 2004. Proendocrine genes coordinate the pancreatic islet differentiation program in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 13245-13250.

Gerrish, K., Cissell, M.A., Stein, R., 2001. The role of hepatic nuclear factor 1 alpha and PDX-1 in transcriptional regulation of the pdx-1 gene. *J Biol Chem* 276, 47775-47784.

Gerrish, K., Gannon, M., Shih, D., Henderson, E., Stoffel, M., Wright, C.V., Stein, R., 2000. Pancreatic beta cell-specific transcription of the pdx-1 gene. The role of conserved upstream control regions and their hepatic nuclear factor 3beta sites. *J Biol Chem* 275, 3485-3492.

Gerrish, K., Van Velkinburgh, J.C., Stein, R., 2004. Conserved transcriptional regulatory domains of the pdx-1 gene. *Mol Endocrinol* 18, 533-548.

Githens, S., 1988. The pancreatic duct cell: proliferative capabilities, specific characteristics, metaplasia, isolation, and culture. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 7, 486-506.

Gradwohl, G., Dierich, A., LeMeur, M., Guillemot, F., 2000. neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 1607-1611.

Gu, G., Dubauskaite, J., Melton, D.A., 2002. Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development* 129, 2447-2457.

Guo, T., Hebrok, M., 2009. Stem cells to pancreatic beta-cells: new sources for diabetes cell therapy. *Endocrine reviews* 30, 214-227.

Hale, M.A., Kagami, H., Shi, L., Holland, A.M., Elsasser, H.P., Hammer, R.E., MacDonald, R.J., 2005. The homeodomain protein PDX1 is required at mid-pancreatic development for the formation of the exocrine pancreas. *Dev Biol* 286, 225-237.

Hara, A., Kadoya, Y., Kojima, I., Yamashina, S., 2007. Rat pancreatic islet is formed by unification of multiple endocrine cell clusters. *Dev Dyn* 236, 3451-3458.

Harrison, K.A., Thaler, J., Pfaff, S.L., Gu, H., Kehrl, J.H., 1999. Pancreas dorsal lobe agenesis and abnormal islets of Langerhans in Hlxb9-deficient mice. *Nat Genet* 23, 71-75.

Haumaitre, C., Barbacci, E., Jenny, M., Ott, M.O., Gradwohl, G., Cereghini, S., 2005. Lack of TCF2/vHNF1 in mice leads to pancreas agenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 1490-1495.

Hebrok, M., Kim, S.K., Melton, D.A., 1998. Notochord repression of endodermal Sonic hedgehog permits pancreas development. *Genes Dev* 12, 1705-1713.

Hendzel MJ, W.Y., Mancini MA et al., 1997. Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma* 106:348–360.

Henquin, J.C., 2009. Regulation of insulin secretion: a matter of phase control and amplitude modulation. *Diabetologia* 52, 739-751.

Henseleit, K.D., Nelson, S.B., Kuhlbrodt, K., Hennings, J.C., Ericson, J., Sander, M., 2005. NKX6 transcription factor activity is required for alpha- and beta-cell development in the pancreas. *Development* 132, 3139-3149.

Hingorani, S.R., Petricoin, E.F., Maitra, A., Rajapakse, V., King, C., Jacobetz, M.A., Ross, S., Conrads, T.P., Veenstra, T.D., Hitt, B.A., Kawaguchi, Y., Johann, D., Liotta, L.A., Crawford, H.C., Putt, M.E., Jacks, T., Wright, C.V., Hruban, R.H., Lowy, A.M., Tuveson, D.A., 2003. Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell* 4, 437-450.

Hogan, B., Beddington, R., Costantini, F., Lacy, E., 1994. Manipulating the mouse embryo, Second ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY.

Holland, A.M., Gonez, L.J., Naselli, G., Macdonald, R.J., Harrison, L.C., 2005. Conditional expression demonstrates the role of the homeodomain transcription factor Pdx1 in maintenance and regeneration of beta-cells in the adult pancreas. *Diabetes* 54, 2586-2595.

Huang, H.P., Liu, M., El-Hodiri, H.M., Chu, K., Jamrich, M., Tsai, M.J., 2000. Regulation of the pancreatic islet-specific gene BETA2 (neuroD) by neurogenin 3. *Mol Cell Biol* 20, 3292-3307.

Jacquemin, P., Lemaigre, F.P., Rousseau, G.G., 2003. The Onecut transcription factor HNF-6 (OC-1) is required for timely specification of the pancreas and acts upstream of Pdx-1 in the specification cascade. *Dev Biol* 258, 105-116.

Jennings, R.E., Berry, A.A., Kirkwood-Wilson, R., Roberts, N.A., Hearn, T., Salisbury, R.J., Blaylock, J., Hanley, K.P., Hanley, N.A., 2013. Development of the human pancreas from foregut to endocrine commitment. *Diabetes* 62, 3514-3522.

Jennings, R.E., Berry, A.A., Strutt, J.P., Gerrard, D.T., Hanley, N.A., 2015. Human pancreas development. *Development* 142, 3126-3137.

Jensen, J.N., Cameron, E., Garay, M.V., Starkey, T.W., Gianani, R., Jensen, J., 2005. Recapitulation of elements of embryonic development in adult mouse pancreatic regeneration. *Gastroenterology* 128, 728-741.

Jensen, J.N., Rosenberg, L.C., Hecksher-Sorensen, J., Serup, P., 2007. Mutant neurogenin-3 in congenital malabsorptive diarrhea. *N Engl J Med* 356, 1781-1782; author reply 1782.

Jha, R.K., Ma, Q., Sha, H., Palikhe, M., 2009. Acute pancreatitis: a literature review. *Med Sci Monit* 15, RA147-156.

Jonsson, J., Carlsson, L., Edlund, T., Edlund, H., 1994. Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature* 371, 606-609.

Jorgensen, M.C., Ahnfelt-Ronne, J., Hald, J., Madsen, O.D., Serup, P., Hecksher-Sorensen, J., 2007. An illustrated review of early pancreas development in the mouse. *Endocrine reviews* 28, 685-705.

Kawaguchi, Y., Cooper, B., Gannon, M., Ray, M., MacDonald, R.J., Wright, C.V., 2002. The role of the transcriptional regulator Ptf1a in converting intestinal to pancreatic progenitors. *Nat Genet* 32, 128-134.

Kim, A., Miller, K., Jo, J., Kilimnik, G., Wojcik, P., Hara, M., 2009. Islet architecture: A comparative study. *Islets* 1, 129-136.

Kim, H., 2008. Cerulein pancreatitis: oxidative stress, inflammation, and apoptosis. *Gut Liver* 2, 74-80.

Kim, S.K., Melton, D.A., 1998. Pancreas development is promoted by cyclopamine, a hedgehog signaling inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13036-13041.

Kodo, K., Yamagishi, H., 2010. GATA transcription factors in congenital heart defects: a commentary on a novel GATA6 mutation in patients with tetralogy of Fallot or atrial septal defect. *J Hum Genet* 55, 637-638.

Kopp, J.L., Dubois, C.L., Schaffer, A.E., Hao, E., Shih, H.P., Seymour, P.A., Ma, J., Sander, M., 2011. Sox9+ ductal cells are multipotent progenitors throughout development but do not produce new endocrine cells in the normal or injured adult pancreas. *Development* 138, 653-665.

Koutsourakis, M., Langeveld, A., Patient, R., Beddington, R., Grosveld, F., 1999. The transcription factor GATA6 is essential for early extraembryonic development. *Development* 126, 723-732.

Krapp, A., Knofler, M., Ledermann, B., Burki, K., Berney, C., Zoerkler, N., Hagenbuchle, O., Wellauer, P.K., 1998. The bHLH protein PTF1-p48 is essential for the formation of the exocrine and the correct spatial organization of the endocrine pancreas. *Genes Dev* 12, 3752-3763.

Kuo, C.T., Morrissey, E.E., Anandappa, R., Sigrist, K., Lu, M.M., Parmacek, M.S., Soudais, C., Leiden, J.M., 1997. GATA4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and heart tube formation. *Genes Dev* 11, 1048-1060.

Lango Allen, H., Flanagan, S.E., Shaw-Smith, C., De Franco, E., Akerman, I., Caswell, R., International Pancreatic Agenesis, C., Ferrer, J., Hattersley, A.T., Ellard, S., 2012. GATA6 haploinsufficiency causes pancreatic agenesis in humans. *Nat Genet* 44, 20-22.

Lee, C.S., Sund, N.J., Behr, R., Herrera, P.L., Kaestner, K.H., 2005. Foxa2 is required for the differentiation of pancreatic alpha-cells. *Dev Biol* 278, 484-495.

Lee, J.C., Smith, S.B., Watada, H., Lin, J., Scheel, D., Wang, J., Mirmira, R.G., German, M.S., 2001. Regulation of the pancreatic pro-endocrine gene neurogenin3. *Diabetes* 50, 928-936.

Lerch, M.M., Adler, G., 1994. Experimental animal models of acute pancreatitis. *Int J Pancreatol* 15, 159-170.

Li, H., Arber, S., Jessell, T.M., Edlund, H., 1999. Selective agenesis of the dorsal pancreas in mice lacking homeobox gene Hlxb9. *Nat Genet* 23, 67-70.

Liao, W.P., Uetzmann, L., Burtscher, I., Lickert, H., 2009. Generation of a mouse line expressing Sox17-driven Cre recombinase with specific activity in arteries. *Genesis* 47, 476-483.

Lin, X., Huo, Z., Liu, X., Zhang, Y., Li, L., Zhao, H., Yan, B., Liu, Y., Yang, Y., Chen, Y.H., 2010. A novel GATA6 mutation in patients with tetralogy of Fallot or atrial septal defect. *J Hum Genet* 55, 662-667.

Lynn, F.C., Smith, S.B., Wilson, M.E., Yang, K.Y., Nekrep, N., German, M.S., 2007. Sox9 coordinates a transcriptional network in pancreatic progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 10500-10505.

Maestro, M.A., Boj, S.F., Luco, R.F., Pierreux, C.E., Cabedo, J., Servitja, J.M., German, M.S., Rousseau, G.G., Lemaigre, F.P., Ferrer, J., 2003. Hnf6 and Tcf2 (MODY5) are linked in a gene network operating in a precursor cell domain of the embryonic pancreas. *Human molecular genetics* 12, 3307-3314.

Maitra, M., Koenig, S.N., Srivastava, D., Garg, V., 2010. Identification of GATA6 sequence variants in patients with congenital heart defects. *Pediatr Res* 68, 281-285.

Marshak, S., Benshushan, E., Shoshkes, M., Havin, L., Cerasi, E., Melloul, D., 2000. Functional conservation of regulatory elements in the pdx-1 gene: PDX-1 and hepatocyte nuclear factor 3beta transcription factors mediate beta-cell-specific expression. *Mol Cell Biol* 20, 7583-7590.

Martinelli, P., Canamero, M., del Pozo, N., Madriles, F., Zapata, A., Real, F.X., 2013. Gata6 is required for complete acinar differentiation and maintenance of the exocrine pancreas in adult mice. *Gut* 62, 1481-1488.

Mastracci, T.L., Sussel, L., 2012. The endocrine pancreas: insights into development, differentiation, and diabetes. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 1, 609-628.

Masui, T., Swift, G.H., Deering, T., Shen, C., Coats, W.S., Long, Q., Elsasser, H.P., Magnuson, M.A., MacDonald, R.J., 2010. Replacement of Rbpj with Rbpjl in the PTF1 complex controls the final maturation of pancreatic acinar cells. *Gastroenterology* 139, 270-280.

Mayhew, C.N., Wells, J.M., 2010. Converting human pluripotent stem cells into beta-cells: recent advances and future challenges. *Current opinion in organ transplantation* 15, 54-60.

McEvoy, R.C., Andersson, J., Sandler, S., Hellerstrom, C., 1984. Multiple low-dose streptozotocin-induced diabetes in the mouse. Evidence for stimulation of a cytotoxic cellular immune response against an insulin-producing beta cell line. *J Clin Invest* 74, 715-722.

McFadden, D.G., Charite, J., Richardson, J.A., Srivastava, D., Firulli, A.B., Olson, E.N., 2000. A GATA-dependent right ventricular enhancer controls dHAND transcription in the developing heart. *Development* 127, 5331-5341.

Molero, X., Adell, T., Skoudy, A., Padilla, M.A., Gomez, J.A., Chalaux, E., Malagelada, J.R., Real, F.X., 2007. Pancreas transcription factor 1alpha expression is regulated in pancreatitis. *Eur J Clin Invest* 37, 791-801.

Molkentin, J.D., 2000. The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, and -6. Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression. *J Biol Chem* 275, 38949-38952.

Molkentin, J.D., Lin, Q., Duncan, S.A., Olson, E.N., 1997. Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis. *Genes Dev* 11, 1061-1072.

Morris, J.P.t., Cano, D.A., Sekine, S., Wang, S.C., Hebrok, M., 2010. Beta-catenin blocks Kras-dependent reprogramming of acini into pancreatic cancer precursor lesions in mice. *J Clin Invest* 120, 508-520.

Motta, P.M., Macchiarelli, G., Nottola, S.A., Correr, S., 1997. Histology of the exocrine pancreas. *Microsc Res Tech* 37, 384-398.

Neuschwander-Tetri, B.A., Burton, F.R., Presti, M.E., Britton, R.S., Janney, C.G., Garvin, P.R., Brunt, E.M., Galvin, N.J., Poulos, J.E., 2000. Repetitive self-limited acute pancreatitis induces pancreatic fibrogenesis in the mouse. *Dig Dis Sci* 45, 665-674.

Newsholme, P., Gaudel, C., McClenaghan, N.H., 2010. Nutrient regulation of insulin secretion and beta-cell functional integrity. *Adv Exp Med Biol* 654, 91-114.

Nostro, M.C., Keller, G., 2012. Generation of beta cells from human pluripotent stem cells: Potential for regenerative medicine. *Seminars in cell & developmental biology* 23, 701-710.

Offield, M.F., Jetton, T.L., Labosky, P.A., Ray, M., Stein, R., Magnuson, M.A., Hogan, B.L.M., Wright, C.V.E., 1996. PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development* 122, 983-995.

Oka, T., Maillet, M., Watt, A.J., Schwartz, R.J., Aronow, B.J., Duncan, S.A., Molkentin, J.D., 2006. Cardiac-specific deletion of Gata4 reveals its requirement for hypertrophy, compensation, and myocyte viability. *Circ Res* 98, 837-845.

Oliver-Krasinski, J.M., Kasner, M.T., Yang, J., Crutchlow, M.F., Rustgi, A.K., Kaestner, K.H., Stoffers, D.A., 2009. The diabetes gene Pdx1 regulates the transcriptional network of pancreatic endocrine progenitor cells in mice. *J Clin Invest* 119, 1888-1898.

Ondine Cleaver, R.J.M., 2010. Developmental Molecular Biology of the Pancreas, in: J. P. Neoptolemos, R.U., J. L. Abbruzzese, M. W. Buchler (Ed.), *Pancreatic Cancer*. Springer, pp. 71-117.

Pan, F.C., Wright, C., 2011. Pancreas organogenesis: from bud to plexus to gland. *Dev Dyn* 240, 530-565.

Patient, R.K., McGhee, J.D., 2002. The GATA family (vertebrates and invertebrates). *Curr Opin Genet Dev* 12, 416-422.

Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, e45.

Pictet, R.L., Clark, W.R., Williams, R.H., Rutter, W.J., 1972. An ultrastructural analysis of the developing embryonic pancreas. *Dev Biol* 29, 436-467.

Poll, A.V., Pierreux, C.E., Lokmane, L., Haumaitre, C., Achouri, Y., Jacquemin, P., Rousseau, G.G., Cereghini, S., Lemaigre, F.P., 2006. A vHNF1/TCF2-HNF6 cascade regulates the transcription factor network that controls generation of pancreatic precursor cells. *Diabetes* 55, 61-69.

Pour, P.M., Pandey, K.K., Batra, S.K., 2003. What is the origin of pancreatic adenocarcinoma? *Mol Cancer* 2, 13.

Quesada, I., Tuduri, E., Ripoll, C., Nadal, A., 2008. Physiology of the pancreatic alpha-cell and glucagon secretion: role in glucose homeostasis and diabetes. *J Endocrinol* 199, 5-19.

Replication, D.I.G., Meta-analysis, C., Asian Genetic Epidemiology Network Type 2 Diabetes, C., South Asian Type 2 Diabetes, C., Mexican American Type 2 Diabetes, C., Type 2 Diabetes Genetic Exploration by Next-generation sequencing in multi-Ethnic Samples, C., Mahajan, A., Go, M.J., Zhang, W., Below, J.E., Gaulton, K.J., Ferreira, T., Horikoshi, M., Johnson, A.D., Ng, M.C., Prokopenko, I., Saleheen, D., Wang, X., Zeggini, E., Abecasis, G.R., Adair, L.S., Almgren, P., Atalay, M., Aung, T., Baldassarre, D., Balkau, B., Bao, Y., Barnett, A.H., Barroso, I., Basit, A., Been, L.F., Beilby, J., Bell, G.I., Benediktsson, R., Bergman, R.N., Boehm, B.O., Boerwinkle, E., Bonnycastle, L.L., Burt,

N., Cai, Q., Campbell, H., Carey, J., Cauchi, S., Caulfield, M., Chan, J.C., Chang, L.C., Chang, T.J., Chang, Y.C., Charpentier, G., Chen, C.H., Chen, H., Chen, Y.T., Chia, K.S., Chidambaram, M., Chines, P.S., Cho, N.H., Cho, Y.M., Chuang, L.M., Collins, F.S., Cornelis, M.C., Couper, D.J., Crenshaw, A.T., van Dam, R.M., Danesh, J., Das, D., de Faire, U., Dedoussis, G., Deloukas, P., Dimas, A.S., Dina, C., Doney, A.S., Donnelly, P.J., Dorkhan, M., van Duijn, C., Dupuis, J., Edkins, S., Elliott, P., Emilsson, V., Erbel, R., Eriksson, J.G., Escobedo, J., Esko, T., Eury, E., Florez, J.C., Fontanillas, P., Forouhi, N.G., Forsen, T., Fox, C., Fraser, R.M., Frayling, T.M., Froguel, P., Frossard, P., Gao, Y., Gertow, K., Gieger, C., Gigante, B., Grallert, H., Grant, G.B., Grrop, L.C., Groves, C.J., Grundberg, E., Guiducci, C., Hamsten, A., Han, B.G., Hara, K., Hassanali, N., Hattersley, A.T., Hayward, C., Hedman, A.K., Herder, C., Hofman, A., Holmen, O.L., Hovingh, K., Hreidarsson, A.B., Hu, C., Hu, F.B., Hui, J., Humphries, S.E., Hunt, S.E., Hunter, D.J., Hveem, K., Hydrie, Z.I., Ikegami, H., Illig, T., Ingelsson, E., Islam, M., Isomaa, B., Jackson, A.U., Jafar, T., James, A., Jia, W., Jockel, K.H., Jonsson, A., Jowett, J.B., Kadowaki, T., Kang, H.M., Kanoni, S., Kao, W.H., Kathiresan, S., Kato, N., Katulanda, P., Keinanen-Kiukaanniemi, K.M., Kelly, A.M., Khan, H., Khaw, K.T., Khor, C.C., Kim, H.L., Kim, S., Kim, Y.J., Kinnunen, L., Klopp, N., Kong, A., Korpi-Hyovalti, E., Kowlessur, S., Kraft, P., Kravic, J., Kristensen, M.M., Krithika, S., Kumar, A., Kumate, J., Kuusisto, J., Kwak, S.H., Laakso, M., Lagou, V., Lakka, T.A., Langenberg, C., Langford, C., Lawrence, R., Leander, K., Lee, J.M., Lee, N.R., Li, M., Li, X., Li, Y., Liang, J., Liju, S., Lim, W.Y., Lind, L., Lindgren, C.M., Lindholm, E., Liu, C.T., Liu, J.J., Lobbens, S., Long, J., Loos, R.J., Lu, W., Luan, J., Lyssenko, V., Ma, R.C., Maeda, S., Magi, R., Mannisto, S., Matthews, D.R., Meigs, J.B., Melander, O., Metspalu, A., Meyer, J., Mirza, G., Mihailov, E., Moebus, S., Mohan, V., Mohlke, K.L., Morris, A.D., Muhleisen, T.W., Muller-Nurasyid, M., Musk, B., Nakamura, J., Nakashima, E., Navarro, P., Ng, P.K., Nica, A.C., Nilsson, P.M., Njolstad, I., Nothen, M.M., Ohnaka, K., Ong, T.H., Owen, K.R., Palmer, C.N., Pankow, J.S., Park, K.S., Parkin, M., Pechlivanis, S., Pedersen, N.L., Peltonen, L., Perry, J.R., Peters, A., Pinidiyapathirage, J.M., Platou, C.G., Potter, S., Price, J.F., Qi, L., Radha, V., Rallidis, L., Rasheed, A., Rathman, W., Rauramaa, R., Raychaudhuri, S., Rayner, N.W., Rees, S.D., Rehnberg, E., Ripatti, S., Robertson, N., Roden, M., Rossin, E.J., Rudan, I., Rybin, D., Saaristo, T.E., Salomaa, V., Saltevo, J., Samuel, M., Sanghera, D.K., Saramies, J., Scott, J., Scott, L.J., Scott, R.A., Segre, A.V., Sehmi, J., Sennblad, B., Shah, N., Shah, S., Shera, A.S., Shu, X.O., Shuldiner, A.R., Sigurdsson, G., Sijbrands, E., Silveira, A., Sim, X., Sivapalaratnam, S., Small, K.S., So, W.Y., Stancakova, A., Stefansson, K., Steinbach, G., Steinthorsdottir, V., Stirrups, K., Strawbridge, R.J., Stringham, H.M., Sun, Q., Suo, C., Syvanen, A.C., Takayanagi, R., Takeuchi, F., Tay, W.T., Teslovich, T.M., Thorand, B., Thorleifsson, G., Thorsteinsdottir, U., Tikkanen, E., Trakalo, J., Tremoli, E., Trip, M.D., Tsai, F.J., Tuomi, T., Tuomilehto, J., Uitterlinden, A.G., Valladares-Salgado, A., Vedantam, S., Veglia, F., Voight, B.F., Wang, C., Wareham, N.J., Wennauer, R., Wickremasinghe, A.R., Wilsgaard, T., Wilson, J.F., Wiltshire, S., Winckler, W., Wong, T.Y., Wood, A.R., Wu, J.Y., Wu, Y., Yamamoto, K., Yamauchi, T., Yang, M., Yengo, L., Yokota, M., Young, R., Zabaneh, D., Zhang, F., Zhang, R., Zheng, W., Zimmet, P.Z., Altshuler, D., Bowden, D.W., Cho, Y.S., Cox, N.J., Cruz, M., Hanis, C.L., Kooner, J., Lee, J.Y., Seielstad, M., Teo, Y.Y., Boehnke, M., Parra, E.J., Chambers, J.C., Tai, E.S., McCarthy, M.I., Morris, A.P., 2014. Genome-wide trans-ancestry meta-analysis provides insight into the genetic architecture of type 2 diabetes susceptibility. *Nat Genet* 46, 234-244.

Rojas, A., De Val, S., Heidt, A.B., Xu, S.M., Bristow, J., Black, B.L., 2005. Gata4 expression in lateral mesoderm is downstream of BMP4 and is activated directly by Forkhead



and GATA transcription factors through a distal enhancer element. *Development* 132, 3405-3417.

Rojas, A., Kong, S.W., Agarwal, P., Gilliss, B., Pu, W.T., Black, B.L., 2008. GATA4 is a direct transcriptional activator of cyclin D2 and Cdk4 and is required for cardiomyocyte proliferation in anterior heart field-derived myocardium. *Mol Cell Biol* 28, 5420-5431.

Rojas, A., Schachterle, W., Xu, S.M., Black, B.L., 2009. An endoderm-specific transcriptional enhancer from the mouse Gata4 gene requires GATA and homeodomain protein-binding sites for function in vivo. *Dev Dyn* 238, 2588-2598.

Rossi, J.M., Dunn, N.R., Hogan, B.L., Zaret, K.S., 2001. Distinct mesodermal signals, including BMPs from the septum transversum mesenchyme, are required in combination for hepatogenesis from the endoderm. *Genes Dev* 15, 1998-2009.

Rukstalis, J.M., Habener, J.F., 2007. Snail2, a mediator of epithelial-mesenchymal transitions, expressed in progenitor cells of the developing endocrine pancreas. *Gene Expr Patterns* 7, 471-479.

Samaras, S.E., Cissell, M.A., Gerrish, K., Wright, C.V., Gannon, M., Stein, R., 2002. Conserved sequences in a tissue-specific regulatory region of the pdx-1 gene mediate transcription in Pancreatic beta cells: role for hepatocyte nuclear factor 3 beta and Pax6. *Mol Cell Biol* 22, 4702-4713.

Samaras, S.E., Zhao, L., Means, A., Henderson, E., Matsuoka, T.A., Stein, R., 2003. The islet beta cell-enriched RIPE3b1/Maf transcription factor regulates pdx-1 expression. *J Biol Chem* 278, 12263-12270.

Schaffer, A.E., Freude, K.K., Nelson, S.B., Sander, M., 2010. Nkx6 transcription factors and Ptf1a function as antagonistic lineage determinants in multipotent pancreatic progenitors. *Dev Cell* 18, 1022-1029.

Schoenberg, M.H., Buchler, M., Gaspar, M., Stinner, A., Younes, M., Melzner, I., Bultmann, B., Beger, H.G., 1990. Oxygen free radicals in acute pancreatitis of the rat. *Gut* 31, 1138-1143.

Scholzen T, G.J., 2000. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol.* 182(3), 311-322.

Schwitzgebel, V.M., Scheel, D.W., Conners, J.R., Kalamaras, J., Lee, J.E., Anderson, D.J., Sussel, L., Johnson, J.D., German, M.S., 2000. Expression of neurogenin3 reveals an islet cell precursor population in the pancreas. *Development* 127, 3533-3542.

Sellick, G.S., Barker, K.T., Stolte-Dijkstra, I., Fleischmann, C., Coleman, R.J., Garrett, C., Gloyn, A.L., Edghill, E.L., Hattersley, A.T., Wellauer, P.K., Goodwin, G., Houlston, R.S., 2004. Mutations in PTF1A cause pancreatic and cerebellar agenesis. *Nat Genet* 36, 1301-1305.

Seymour, P.A., Freude, K.K., Tran, M.N., Mayes, E.E., Jensen, J., Kist, R., Scherer, G., Sander, M., 2007. SOX9 is required for maintenance of the pancreatic progenitor cell pool. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 1865-1870.

Seymour, P.A., Shih, H.P., Patel, N.A., Freude, K.K., Xie, R., Lim, C.J., Sander, M., 2012. A Sox9/Fgf feed-forward loop maintains pancreatic organ identity. *Development* 139, 3363-3372.

Shaw-Smith, C., De Franco, E., Lango Allen, H., Batlle, M., Flanagan, S.E., Borowiec, M., Taplin, C.E., van Alfen-van der Velden, J., Cruz-Rojo, J., Perez de Nanclares, G., Miedzybrodzka, Z., Deja, G., Wlodarska, I., Mlynarski, W., Ferrer, J., Hattersley, A.T., Ellard, S., 2014. GATA4 mutations are a cause of neonatal and childhood-onset diabetes. *Diabetes* 63, 2888-2894.

Shih, H.P., Wang, A., Sander, M., 2013. Pancreas organogenesis: from lineage determination to morphogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 29, 81-105.

Slack, J.M., 1995. Developmental biology of the pancreas. *Development* 121, 1569-1580.

Smith, S.B., Gasa, R., Watada, H., Wang, J., Griffen, S.C., German, M.S., 2003. Neurogenin3 and hepatic nuclear factor 1 cooperate in activating pancreatic expression of Pax4. *J Biol Chem* 278, 38254-38259.

Smith, S.B., Qu, H.Q., Taleb, N., Kishimoto, N.Y., Scheel, D.W., Lu, Y., Patch, A.M., Grabs, R., Wang, J., Lynn, F.C., Miyatsuka, T., Mitchell, J., Seerke, R., Desir, J., Vanden Eijnden, S., Abramowicz, M., Kacet, N., Weill, J., Renard, M.E., Gentile, M., Hansen, I., Dewar, K., Hattersley, A.T., Wang, R., Wilson, M.E., Johnson, J.D., Polychronakos, C., German, M.S., 2010. Rfx6 directs islet formation and insulin production in mice and humans. *Nature* 463, 775-780.

Sodhi, C.P., Li, J., Duncan, S.A., 2006. Generation of mice harbouring a conditional loss-of-function allele of Gata6. *BMC Dev Biol* 6, 19.

Solar, M., Cardalda, C., Houbracken, I., Martin, M., Maestro, M.A., De Medts, N., Xu, X., Grau, V., Heimberg, H., Bouwens, L., Ferrer, J., 2009. Pancreatic exocrine duct cells give rise to insulin-producing beta cells during embryogenesis but not after birth. *Dev Cell* 17, 849-860.

Soria, B., Bedoya, F.J., Tejedo, J.R., Hmadcha, A., Ruiz-Salmeron, R., Lim, S., Martin, F., 2008. Cell therapy for diabetes mellitus: an opportunity for stem cells? *Cells Tissues Organs* 188, 70-77.

Soyer, J., Flasse, L., Raffelsberger, W., Beucher, A., Orvain, C., Peers, B., Ravassard, P., Vermot, J., Voz, M.L., Mellitzer, G., Gradwohl, G., 2010. Rfx6 is an Ngn3-dependent winged helix transcription factor required for pancreatic islet cell development. *Development* 137, 203-212.

Stanger, B.Z., Tanaka, A.J., Melton, D.A., 2007. Organ size is limited by the number of embryonic progenitor cells in the pancreas but not the liver. *Nature* 445, 886-891.

Steiner, D.J., Kim, A., Miller, K., Hara, M., 2010. Pancreatic islet plasticity: interspecies comparison of islet architecture and composition. *Islets* 2, 135-145.

Stoffers, D.A., Heller, R.S., Miller, C.P., Habener, J.F., 1999. Developmental expression of the homeodomain protein IDX-1 in mice transgenic for an IDX-1 promoter/lacZ transcriptional reporter. *Endocrinology* 140, 5374-5381.

Stoffers, D.A., Zinkin, N.T., Stanojevic, V., Clarke, W.L., Habener, J.F., 1997. Pancreatic agenesis attributable to a single nucleotide deletion in the human IPF1 gene coding sequence. *Nat Genet* 15, 106-110.

Straub, S.G., Sharp, G.W., 2002. Glucose-stimulated signaling pathways in biphasic insulin secretion. *Diabetes Metab Res Rev* 18, 451-463.

Sumazaki, R., Shiojiri, N., Isoyama, S., Masu, M., Keino-Masu, K., Osawa, M., Nakauchi, H., Kageyama, R., Matsui, A., 2004. Conversion of biliary system to pancreatic tissue in Hes1-deficient mice. *Nat Genet* 36, 83-87.

Sussel, L., Kalamaras, J., Hartigan-O'Connor, D.J., Meneses, J.J., Pedersen, R.A., Rubenstein, J.L., German, M.S., 1998. Mice lacking the homeodomain transcription factor Nkx2.2 have diabetes due to arrested differentiation of pancreatic beta cells. *Development* 125, 2213-2221.

Suzuki, S., Nakao, A., Sarhat, A.R., Furuya, A., Matsuo, K., Tanahashi, Y., Kajino, H., Azuma, H., 2014. A case of pancreatic agenesis and congenital heart defects with a

novel GATA6 nonsense mutation: evidence of haploinsufficiency due to nonsense-mediated mRNA decay. *Am J Med Genet A* 164A, 476-479.

Thomas, M.K., Rastalsky, N., Lee, J.H., Habener, J.F., 2000. Hedgehog signaling regulation of insulin production by pancreatic beta- cells. *Diabetes* 49, 2039-2047.

Thompson, N., Gesina, E., Scheinert, P., Bucher, P., Grapin-Botton, A., 2012. RNA profiling and chromatin immunoprecipitation-sequencing reveal that PTF1a stabilizes pancreas progenitor identity via the control of MNX1/HLXB9 and a network of other transcription factors. *Mol Cell Biol* 32, 1189-1199.

Travers, M.E., Mackay, D.J., Dekker Nitert, M., Morris, A.P., Lindgren, C.M., Berry, A., Johnson, P.R., Hanley, N., Groop, L.C., McCarthy, M.I., Gloyn, A.L., 2013. Insights into the molecular mechanism for type 2 diabetes susceptibility at the KCNQ1 locus from temporal changes in imprinting status in human islets. *Diabetes* 62, 987-992.

von Figura, G., Morris, J.P.t., Wright, C.V., Hebrok, M., 2013. Nr5a2 maintains acinar cell differentiation and constrains oncogenic Kras-mediated pancreatic neoplastic initiation. *Gut*.

Wang, J., Cortina, G., Wu, S.V., Tran, R., Cho, J.H., Tsai, M.J., Bailey, T.J., Jamrich, M., Ament, M.E., Treem, W.R., Hill, I.D., Vargas, J.H., Gershman, G., Farmer, D.G., Reyen, L., Martin, M.G., 2006. Mutant neurogenin-3 in congenital malabsorptive diarrhea. *N Engl J Med* 355, 270-280.

Watada, H., Scheel, D.W., Leung, J., German, M.S., 2003. Distinct gene expression programs function in progenitor and mature islet cells. *J Biol Chem* 278, 17130-17140.

Watt, A.J., Zhao, R., Li, J., Duncan, S.A., 2007. Development of the mammalian liver and ventral pancreas is dependent on GATA4. *BMC Dev Biol* 7, 37.

Weedon, M.N., Cebola, I., Patch, A.M., Flanagan, S.E., De Franco, E., Caswell, R., Rodriguez-Segui, S.A., Shaw-Smith, C., Cho, C.H., Lango Allen, H., Houghton, J.A., Roth, C.L., Chen, R., Hussain, K., Marsh, P., Vallier, L., Murray, A., International Pancreatic Agenesis, C., Ellard, S., Ferrer, J., Hattersley, A.T., 2014. Recessive mutations in a distal PTF1A enhancer cause isolated pancreatic agenesis. *Nat Genet* 46, 61-64.

Wessells, N.K., 1964. DNA Synthesis, Mitosis, and Differentiation in Pancreatic Acinar Cells in Vitro. *J Cell Biol* 20, 415-433.

Wicksteed, B., Brissova, M., Yan, W., Opland, D.M., Plank, J.L., Reinert, R.B., Dickson, L.M., Tamarina, N.A., Philipson, L.H., Shostak, A., Bernal-Mizrachi, E., Elghazi, L., Roe, M.W., Labosky, P.A., Myers, M.G., Jr., Gannon, M., Powers, A.C., Dempsey, P.J., 2010. Conditional gene targeting in mouse pancreatic ss-Cells: analysis of ectopic Cre transgene expression in the brain. *Diabetes* 59, 3090-3098.

Wiebe, P.O., Kormish, J.D., Roper, V.T., Fujitani, Y., Alston, N.I., Zaret, K.S., Wright, C.V., Stein, R.W., Gannon, M., 2007. Ptf1a binds to and activates area III, a highly conserved region of the Pdx1 promoter that mediates early pancreas-wide Pdx1 expression. *Mol Cell Biol* 27, 4093-4104.

Willemer, S., Elsasser, H.P., Adler, G., 1992. Hormone-induced pancreatitis. *Eur Surg Res* 24 Suppl 1, 29-39.

Xuan, S., Borok, M.J., Decker, K.J., Battle, M.A., Duncan, S.A., Hale, M.A., Macdonald, R.J., Sussel, L., 2012. Pancreas-specific deletion of mouse Gata4 and Gata6 causes pancreatic agenesis. *J Clin Invest* 122, 3516-3528.

Yang, Y.P., Thorel, F., Boyer, D.F., Herrera, P.L., Wright, C.V., 2011. Context-specific alpha- to-beta-cell reprogramming by forced Pdx1 expression. *Genes Dev* 25, 1680-1685.

Yoshida, T.a.H., D., 1994. Murine pancreatic ductal adenocarcinoma produced by in vitro transduction of polyoma middle T oncogene into the islets of Langerhans. *Am J Pathol* 145, 671-684.

Zaret, K.S., 2008. Genetic programming of liver and pancreas progenitors: lessons for stem-cell differentiation. *Nat Rev Genet* 9, 329-340.

Zhang, H., Ables, E.T., Pope, C.F., Washington, M.K., Hipkens, S., Means, A.L., Path, G., Seufert, J., Costa, R.H., Leiter, A.B., Magnuson, M.A., Gannon, M., 2009. Multiple, temporal-specific roles for HNF6 in pancreatic endocrine and ductal differentiation. *Mech Dev* 126, 958-973.

Zhang, Y., Goss, A.M., Cohen, E.D., Kadzik, R., Lepore, J.J., Muthukumaraswamy, K., Yang, J., DeMayo, F.J., Whitsett, J.A., Parmacek, M.S., Morrissey, E.E., 2008. A Gata6-Wnt pathway required for epithelial stem cell development and airway regeneration. *Nat Genet* 40, 862-870.

Zhao, R., Watt, A.J., Battle, M.A., Li, J., Bondow, B.J., Duncan, S.A., 2008. Loss of both GATA4 and GATA6 blocks cardiac myocyte differentiation and results in acardia in mice. *Dev Biol* 317, 614-619.

Zhou, Q., Law, A.C., Rajagopal, J., Anderson, W.J., Gray, P.A., Melton, D.A., 2007. A multipotent progenitor domain guides pancreatic organogenesis. *Dev Cell* 13, 103-114.

Zorn, A.M., Wells, J.M., 2009. Vertebrate endoderm development and organ formation. *Annual review of cell and developmental biology* 25, 221-251.



## VIII.ANEXOS



# GATA4 and GATA6 control mouse pancreas organogenesis

Manuel Carrasco, Irene Delgado, Bernat Soria, Francisco Martín, and Anabel Rojas

Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER), Sevilla, Spain.  
Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), Barcelona, Spain.

**Recently, heterozygous mutations in *GATA6* have been found in neonatal diabetic patients with failed pancreatic organogenesis. To investigate the roles of GATA4 and GATA6 in mouse pancreas organogenesis, we conditionally inactivated these genes within the pancreas. Single inactivation of either gene did not have a major impact on pancreas formation, indicating functional redundancy. However, double *Gata4/Gata6* mutant mice failed to develop pancreata, died shortly after birth, and displayed hyperglycemia. Morphological defects in *Gata4/Gata6* mutant pancreata were apparent during embryonic development, and the epithelium failed to expand as a result of defects in cell proliferation and differentiation. The number of multipotent pancreatic progenitors, including PDX1<sup>+</sup> cells, was reduced in the *Gata4/Gata6* mutant pancreatic epithelium. Remarkably, deletion of only 1 *Gata6* allele on a *Gata4* conditional knockout background severely reduced pancreatic mass. In contrast, a single WT allele of *Gata4* in *Gata6* conditional knockout mice was sufficient for normal pancreatic development, indicating differential contributions of GATA factors to pancreas formation. Our results place GATA factors at the top of the transcriptional network hierarchy controlling pancreas organogenesis.**

## Introduction

In vertebrates, the GATA zinc finger transcription factor family comprises 6 members that recognize the consensus-binding site A/T-GATA-A/G in the promoter regions of multiple genes (1). Studies have shown that GATA1, GATA2, and GATA3 are involved in hematopoietic cell differentiation, whereas GATA4, GATA5, and GATA6 control specification and differentiation of mesoderm- and endoderm-derived cell types (2, 3). In humans, *GATA4* and *GATA6* mutations have been reported to cause congenital heart diseases (4–7), highlighting the crucial roles of these factors in embryonic development. More recently, genome sequencing of 27 neonatal diabetic patients with pancreatic agenesis or severe pancreas hypoplasia revealed that half of the patients had spontaneous heterozygous mutations in the *GATA6* gene (8). These findings add *GATA6* to the short list of genes, including *PDX1* and *PTF1A*, identified to date whose inactivation causes pancreatic agenesis in humans and indicates a role for *GATA6* in pancreas morphogenesis.

Studies in mice have shown that *GATA6* is broadly coexpressed with *GATA4* in the early foregut endoderm and later throughout the nascent pancreatic epithelium (9). As embryonic development proceeds and pancreatic cells differentiate into endocrine and exocrine lineages, *Gata4* and *Gata6* expression become mutually exclusive. *Gata4* is expressed in digestive enzyme-producing acinar cells, whereas *Gata6* expression is restricted to endocrine islets (10). The dynamic expression pattern of *Gata4* and *Gata6* during pancreatic development suggests a functional role for these transcription factors in pancreas development. Efforts to elucidate the role of *GATA4* and *GATA6* in pancreas formation have been hampered by the early embryonic lethality of *Gata4*- and *Gata6*-null mice. *Gata4*-null mice die at E8.5, exhibiting defects in the heart tube, extraembryonic endoderm, and ventral foregut morphogenesis (11, 12).

Similarly, *Gata6*-null mice do not develop beyond gastrulation due to defects in extraembryonic tissues and die in utero (13).

Several strategies have been used to circumvent the early embryonic lethality of *Gata4*- and *Gata6*-null mice. By using tetraploid complementation approaches, it has been shown that *Gata4*<sup>-/-</sup> or *Gata6*<sup>-/-</sup> mutant embryos fail to induce the pancreatic developmental program (14). However, it remains unclear whether these phenotypes reflect a cell-autonomous role of GATA factors in pancreas development. In other studies, transgenic mice were engineered to overexpress *GATA4* or *GATA6* protein fused to the repressor domain of the *Drosophila* engrailed protein in the *Pdx1* expression domain. These mice exhibited a total absence or severe reduction of pancreatic mass (9). Together, these studies point to an autonomous role of GATA factors in embryonic pancreas development.

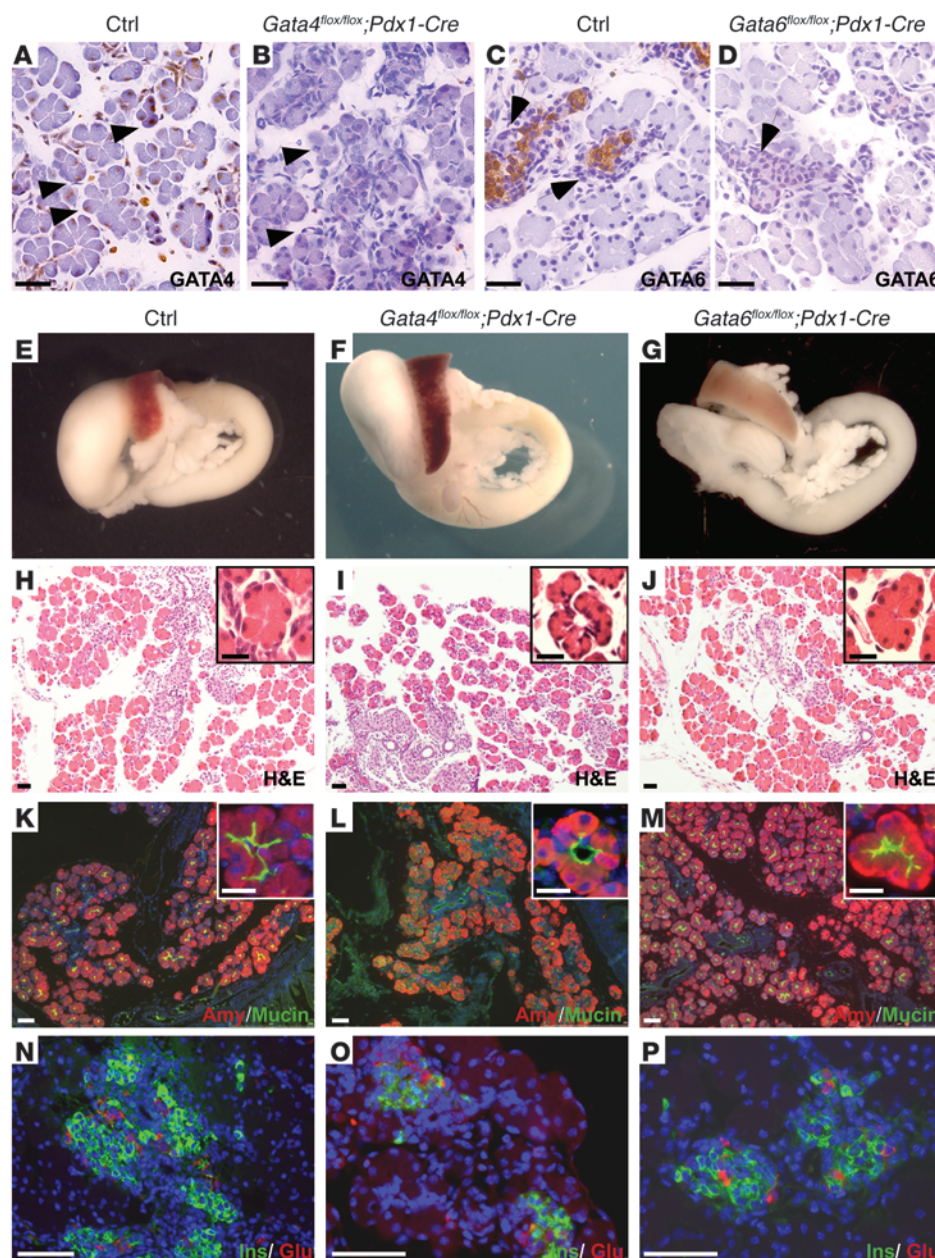
To determine whether *GATA4* and *GATA6* play a functional role in pancreas formation, we have conditionally inactivated these genes in the pancreatic progenitor domain via Cre/lox technology. While the lack of either *GATA4* or *GATA6* activity appears not to have a major impact in pancreas morphogenesis, the inactivation of both *Gata4* and *Gata6* in the pancreatic primordia leads to pancreatic agenesis, indicating a functional redundancy for these transcription factors during pancreas formation. The pancreatic epithelium fails to grow, and pancreatic cell proliferation is reduced in *Gata4/Gata6* double-mutant mice. Cell commitment toward endocrine and exocrine lineages is also severely impaired, and expression of several multipotent pancreatic progenitor markers, including *Pdx1*, is reduced in the absence of *GATA4* and *GATA6* activity. Remarkably, deletion of only 1 allele of *Gata6* in a *Gata4* conditional knockout background results in severe pancreas hypoplasia. In contrast, a single allele of *Gata4* in the absence of *Gata6* WT alleles is sufficient for normal pancreatic development, indicating that *GATA4* and *GATA6* are not completely equivalent in regulating pancreas formation. We demonstrate that *GATA4* and *GATA6* transcription factors bind to 2 conserved GATA sites in the conserved area III of *Pdx1* by ChIP and EMSA. Furthermore, these GATA sites are required for *Pdx1* promoter activity in trans-

**Authorship note:** Manuel Carrasco and Irene Delgado contributed equally to this work.

**Conflict of interest:** The authors have declared that no conflict of interest exists.

**Citation for this article:** *J Clin Invest*. 2012;122(10):3504–3515. doi:10.1172/JCI63240.



**Figure 1**

Single inactivation of *Gata4* and *Gata6* does not affect pancreas formation. (A–D) Immunohistochemical analyses show strong expression of GATA4 in acinar cells (arrowheads in A) and GATA6 in endocrine cells (arrows in C) in pancreatic sections of control mice at P1. Loss of GATA4 (B, arrowheads) and GATA6 (D, arrows) in newborn conditional mutant mice is confirmed by immunohistochemical analysis. (E–G) Gross morphology of neonatal WT and conditional mutant guts. H&E-stained sections of newborn control (H), *Gata4* (I), and *Gata6* (J) conditional knockout pancreata does not reveal major defects in pancreas architecture. Mature acinar (amylase), ductal (mucin) (K–M), and islet (insulin and glucagon) markers (N–P) are normally expressed in single *Gata4* and *Gata6* conditional knockout mice. Insets in H–M show higher magnification of acinar cells. Mild ductal dilation in acinar cells of *Gata4<sup>flox/flox</sup>;Pdx1-Cre* is observed (I and L, insets). Nuclei are counterstained with DAPI in K–P. Scale bars: 50 μm; 25 μm (insets).

genic mice. Together, our results demonstrate a crucial role for GATA factors in pancreas formation and identify *Pdx1* as a direct target of GATA factors.

## Results

### Single inactivation of *Gata4* and *Gata6* does not affect pancreas formation.

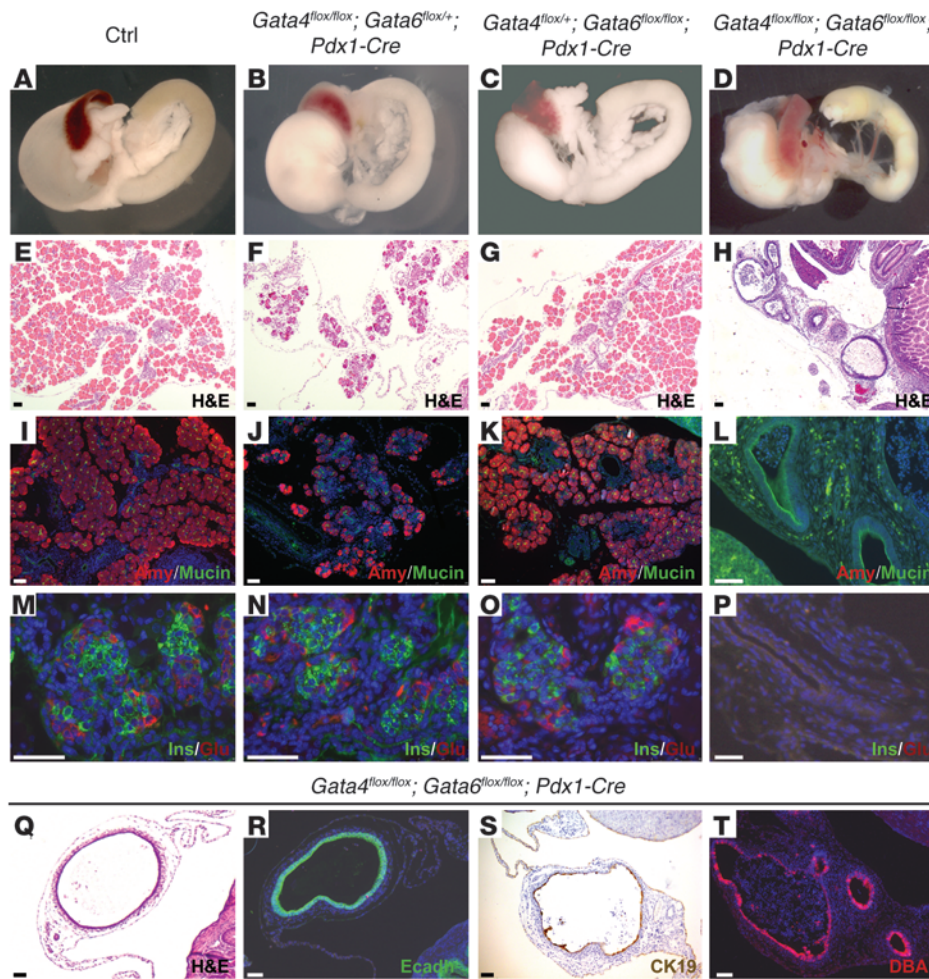
To investigate the role of GATA4 and GATA6 in pancreas development, mice with a conditional (flox) allele of *Gata4* (*Gata4<sup>flox/flox</sup>*) or *Gata6* (*Gata6<sup>flox/flox</sup>*) were crossed to a transgenic mouse line that expresses Cre recombinase under the control of the pancreatic and duodenal homeobox gene 1 (*Pdx1*) promoter (*Pdx1-Cre* mice) (15). *Pdx1* is expressed early in the multipotent pancreatic progenitors that give rise to all pancreatic cell types, thus allowing gene inactivation in the entire pancreas (15). Expression analysis of Cre activity in *Pdx1-Cre*;*Rosa26R* transgenic mice revealed robust *lacZ* stain-

ing in the pancreatic epithelium as early as E9.5 (Supplemental Figure 1; supplemental material available online with this article; doi:10.1172/JCI63240DS1). *Gata4<sup>flox/flox</sup>* and *Gata6<sup>flox/flox</sup>* mice have been used previously to successfully analyze the role of these transcription factors in other organs, such as heart and lung (16, 17). *Gata4<sup>flox/flox</sup>;Pdx1-Cre* and *Gata6<sup>flox/flox</sup>;Pdx1-Cre* mice were born at the expected Mendelian frequency and appeared overtly normal. Immunohistochemical staining demonstrated an efficient recombination of *Gata4* and *Gata6* floxed alleles by Cre recombinase in pancreatic tissue (Figure 1, A–D). Gross morphological examination and histological analysis by H&E staining of newborn pancreata did not reveal obvious defects in either *Gata4<sup>flox/flox</sup>;Pdx1-Cre* or *Gata6<sup>flox/flox</sup>;Pdx1-Cre* mice when compared with control littermates (Figure 1, E–J). Occasional, mild ductal dilation in acinar cells of *Gata4<sup>flox/flox</sup>;Pdx1-Cre* newborn pancreata was detected (Figure 1I).





## research article

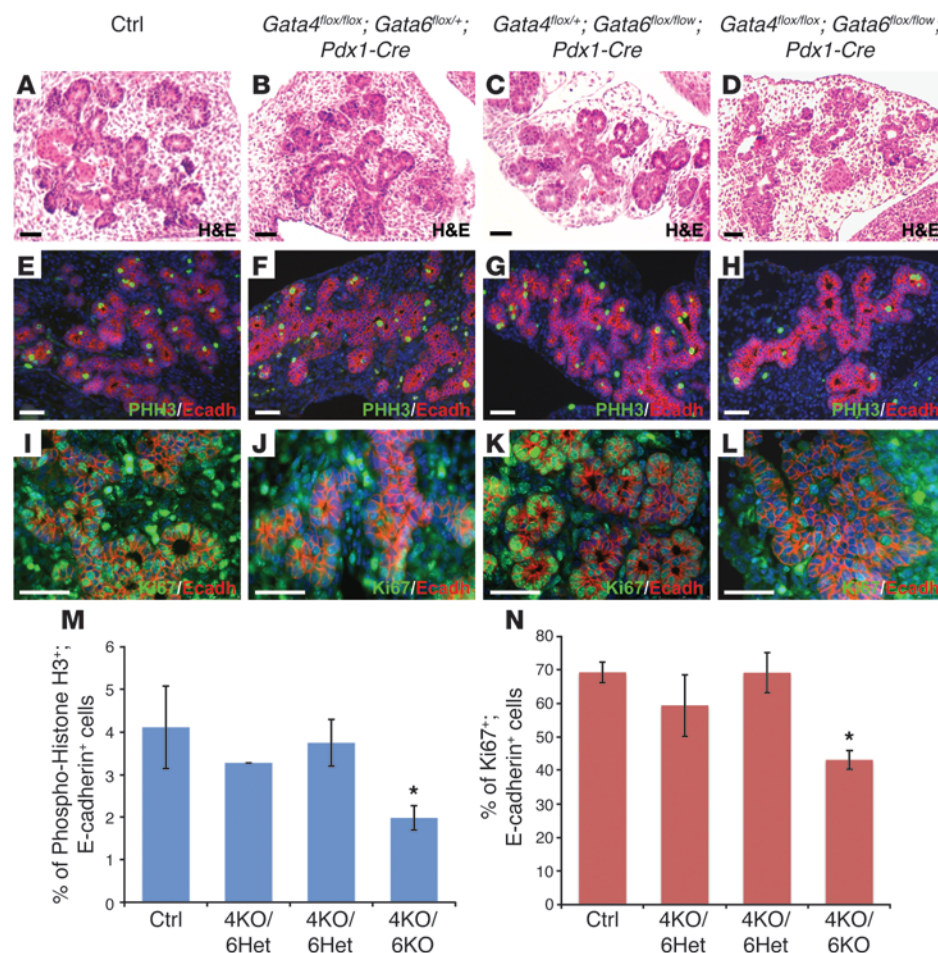
**Figure 2**

Pancreatic agenesis in *Gata4/Gata6* double mutant. Gross appearance of neonatal WT and conditional mutant guts (A–D) and pancreatic sections stained with H&E (E–H) reveal the abnormal morphology of double-mutant pancreata at P1. *Gata4<sup>fllox/fllox</sup>;Gata6<sup>fllox/+</sup>;Pdx1-Cre* mice show pancreatic hypoplasia with scarcity of acinar cells (B and F). *Gata4<sup>fllox/+</sup>;Gata6<sup>fllox/fllox</sup>;Pdx1-Cre* mice display normal pancreatic mass and architecture (C and G). Immunohistochemical analysis shows reduced expression of the acinar marker, amylase, in *Gata4<sup>fllox/fllox</sup>;Gata6<sup>fllox/+</sup>;Pdx1-Cre* pancreatic sections (J) compared with *Gata4<sup>fllox/+</sup>;Gata6<sup>fllox/fllox</sup>;Pdx1-Cre* (K) and control littermates (I). The double-mutant pancreatic remnant displays cystic structures surrounded by abundant stroma (H, L, P, and Q). The cystic structures express mucin (L) and cytokeratin 19 (S) and react with DBA lectin (T), which are markers of differentiated ductal cells. Immunostaining for E-cadherin confirms the epithelial nature of the cysts (R). Insulin and glucagon staining reveals normal differentiation of the endocrine lineage in *Gata4<sup>fllox/fllox</sup>;Gata6<sup>fllox/+</sup>;Pdx1-Cre* (N) and *Gata4<sup>fllox/+</sup>;Gata6<sup>fllox/fllox</sup>;Pdx1-Cre* (O) mutant mice in comparison with control mice (M). In contrast, *Gata4/Gata6* double-mutant mice lack endocrine cells (P). Counterstaining with DAPI was performed to reveal nuclei. Scale bars: 50  $\mu$ m.

However, this phenotype was not observed in adult mice (data not shown), indicating a transient role for GATA4 in early exocrine formation. Immunohistochemical analysis for different epithelial cell lineages (acinar, ductal, and islet) within the pancreas revealed that pancreatic cell differentiation was unaffected in *Gata4<sup>fllox/fllox</sup>;Pdx1-Cre* and *Gata6<sup>fllox/fllox</sup>;Pdx1-Cre* mutant mice (Figure 1, K–P). Furthermore, *Gata4<sup>fllox/fllox</sup>;Pdx1-Cre* and *Gata6<sup>fllox/fllox</sup>;Pdx1-Cre* mice exhibited normal glucose tolerance to intraperitoneal glucose load (Supplemental Figure 2). Taken together, our results show that pancreas morphogenesis is not affected by inactivation of either GATA4 or GATA6 alone.

**Pancreatic agenesis in GATA4 and GATA6 double-mutant mice.** Previous studies have shown that *Gata4* and *Gata6* have overlapping expression patterns at early stages of pancreas formation, when the pancreatic epithelium comprises mainly multipotent pancreatic progenitor cells (MPCs) (9) (see also Supplemental Figure 4). Since pancreas formation is unaffected in individual *Gata4* and *Gata6* conditional knockout mice, we reasoned that these transcription factors might have redundant roles during pancreas development. To test this hypothesis, we generated double *Gata4<sup>fllox/fllox</sup>;Gata6<sup>fllox/fllox</sup>;Pdx1-Cre* mutant mice (double-mutant mice hereafter). Double-mutant mice displayed growth retardation and hyperglycemia and died shortly after birth (data not shown). Dissection of newborn double-mutant mice revealed a near total absence of pancreatic tissue (Figure 2D). Close histological analysis of the pancreatic remnant revealed the presence of epithelial cysts and abundant stroma (Figure 2, H and Q), while exocrine and endocrine tissue were almost completely absent (Figure 2, L and P). Cysts comprised epithelial cells that express mature ductal markers, including cytokeratin 19 (Figure 2S), and react with lectin *Dolichos biflorus* agglutinin (DBA) (Figure 2T). Although the majority of double-mutant mice displayed pancreatic agenesis, the degree of pancreatic tissue loss was variable among individual mutant pups, with approximately 20% of double-mutant mice displaying severe pancreatic hypoplasia. Histological analysis of hypoplastic pancreata revealed well-differentiated tissue (Supplemental Figure 3). However, GATA4 and GATA6 expression was still observed in these cells, indicat-

ing inefficient excision of *Gata4* and *Gata6* floxed alleles, perhaps relating to the number of floxed alleles requiring recombination (Supplemental Figure 2 and data not shown). *Pdx1-Cre* activity in pancreas is reported to be mosaic (15), and thus it is conceivable that unrecombined *Gata4<sup>+</sup>Gata6<sup>+</sup>* progenitor cells might have partially repopulated the pancreas in double-mutant mice. The phenotype of the double-mutant mice suggests that loss of both GATA4 and GATA6 confers a competitive disadvantage to developing pancreatic cells. A dramatic reduction in pancreatic mass was also observed in *Gata4<sup>fllox/fllox</sup>;Gata6<sup>fllox/+</sup>;Pdx1-Cre* mutant mice (Figure 2, B and F), indicating that pancreas formation is sensitive to reduced *Gata6* dosage.

**Figure 3**

Pancreatic epithelial expansion is impaired in the absence of GATA4 and GATA6 activity. The pancreatic epithelia of control, *Gata4*<sup>flox/flox</sup>;*Gata6*<sup>flox/+</sup>;*Pdx1-Cre*, and *Gata4*<sup>flox/+</sup>;*Gata6*<sup>flox/flox</sup>;*Pdx1-Cre* embryos at E13.5 display normal morphology (A–C), whereas double-mutant pancreatic epithelium appears disorganized and reduced in epithelial area (D). Immunohistochemistry analysis of the mitotic marker phospho-histone H3 (PHH3) reveals a significant reduction in proliferating pancreatic epithelial cells in the double-mutant (H) compared with littermate embryos at E13.5 (E–G). Immunostaining with another proliferation marker, Ki67, confirms the reduction in proliferation of E13.5 pancreatic epithelial cells in the double mutant compared with littermates (I–L). Counterstaining with DAPI was performed to reveal nuclei. Quantification of proliferating cells, measured as the number of PHH3 and Ki67-positive cells (M and N, respectively) per E-cadherin-positive cells. \**P* < 0.05. Scale bars: 50  $\mu$ m.

*Gata4*<sup>flox/flox</sup>;*Gata6*<sup>flox/+</sup>;*Pdx1-Cre* mutant mice displayed severe acinar cell loss, and the architecture of remaining acini appeared impaired (Figure 2, F and J). Interestingly, tissue architecture of *Gata4*<sup>flox/+</sup>;*Gata6*<sup>flox/flox</sup>;*Pdx1-Cre* mutant pancreata was completely normal (Figure 2, C, G, K, and O), indicating that GATA4 and GATA6 are not completely equivalent in regulating pancreas formation. Together, our results indicate that pancreatic morphogenesis requires GATA4 and GATA6 activity and that these transcription factors play redundant functions in this process.

**Pancreatic epithelium of *Gata4/Gata6* double-mutant embryos fails to expand.** To delineate the role of GATA4 and GATA6 during pancreas development, we characterized the pancreatic morphology of double-mutant mice at different developmental stages. During the early stages of pancreatic development, when bud formation occurs (E11.5), *Gata4* and *Gata6* expression completely overlapped in the pancreatic epithelium (Supplemental Figure 4). However, no major morphological changes in pancreatic epithelia of the double-mutant mice were observed (Supplemental Figure 4). Efficient inactivation of the *Gata4* and *Gata6* genes by Cre recombinase at this developmental stage was confirmed by immunohistochemistry (Supplemental Figure 4). By E13.5, the pancreatic epithelium expands and undergoes extensive branching to form a network of tubules. Concomitantly, a massive wave of endocrine and acinar cell differentiation, known as the secondary transition, begins (18, 19). At this embryonic stage, *Gata6* is homogeneously expressed throughout the pancreatic epithelium (Supplemental Figure 4). In contrast, *Gata4* displays a

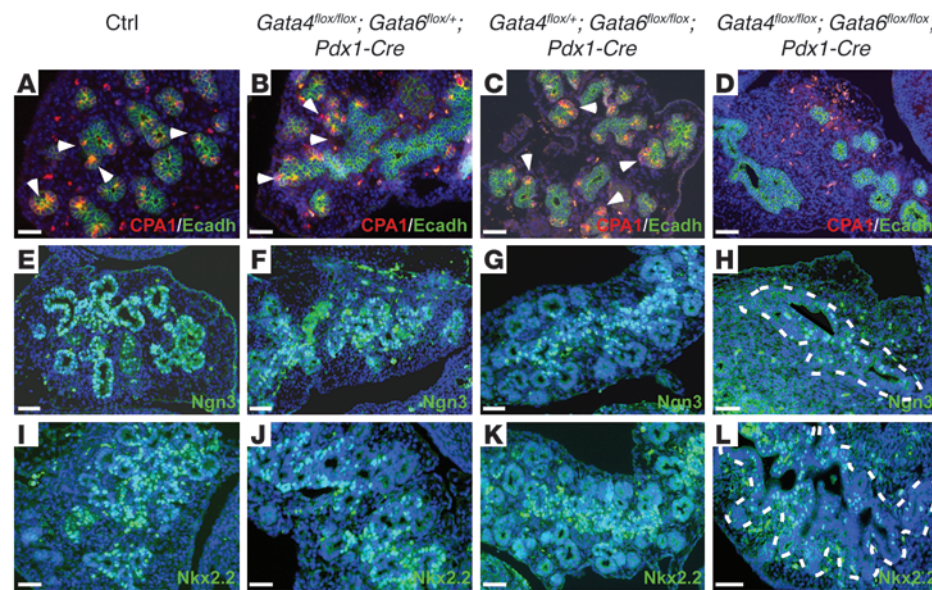
very specific expression pattern, restricted to the tips of the branching ductal epithelium, which will further adopt an acini fate (Supplemental Figure 4). Histological analysis of double-mutant embryos revealed a smaller and disorganized epithelium compared with *Gata4*<sup>flox/flox</sup>;*Gata6*<sup>flox/+</sup>;*Pdx1-Cre*, *Gata4*<sup>flox/+</sup>;*Gata6*<sup>flox/flox</sup>;*Pdx1-Cre*, and control embryos, suggesting that epithelial expansion was disrupted (Figure 3, A–D). Furthermore, immunohistochemical staining for mucin on whole-mount pancreata revealed a significant reduction in the pancreatic epithelial area of the double mutant when compared with control littermates (Supplemental Figure 5). Consistent with these data, pancreatic epithelial morphogenesis was severely affected in double-mutant embryos at E15.5 (Supplemental Figure 4). These results indicate that pancreatic agenesis in newborn double-mutant mice is a consequence of defective pancreatic morphogenesis during early pancreatic development.

**Defects in proliferation of pancreatic progenitors in *Gata4/Gata6* double-mutant embryos.** During pancreatic bud growth, extensive proliferation of the pancreatic epithelial cells occurs. To determine whether pancreatic growth arrest in double-mutant mice was due to defects in proliferation of pancreatic epithelial cells, we performed immunohistochemical analyses for proliferation markers at E13.5. Quantification for the mitotic marker phospho-histone H3 revealed a 50% reduction in proliferating cell number in the pancreatic epithelium of the double-mutant embryos when compared with control, *Gata4*<sup>flox/flox</sup>;*Gata6*<sup>flox/+</sup>;*Pdx1-Cre*, and *Gata4*<sup>flox/+</sup>;*Gata6*<sup>flox/flox</sup>;*Pdx1-Cre* littermates (Figure 3, E–H, and M). These results were con-





## research article

**Figure 4**

Endocrine and acinar differentiation are compromised in *Gata4/Gata6* double-mutant embryos. The enzyme *Carboxypeptidase A1* (*Cpa1*) is expressed in the multipotent progenitor cell population located at the tip of the E13.5 branching epithelium in control, *Gata4<sup>flox/flox</sup>;Gata6<sup>flox/+</sup>;Pdx1-Cre*, and *Gata4<sup>flox/+</sup>;Gata6<sup>flox/flox</sup>;Pdx1-Cre* mice (A–C, arrowheads). In stark contrast, *Cpa1*<sup>+</sup> cells were not detected in the double-mutant pancreatic epithelium (D). The proendocrine markers *Ngn3* (E–G) and *Nkx2.2* (I–K) were mainly expressed in the epithelial trunk of control, *Gata4<sup>flox/flox</sup>;Gata6<sup>flox/+</sup>;Pdx1-Cre*, and *Gata4<sup>flox/+</sup>;Gata6<sup>flox/flox</sup>;Pdx1-Cre* embryos at E13.5. On the contrary, endocrine differentiation is disrupted in the double-mutant embryos as the number of cells expressing *Ngn3* (H) and *Nkx2.2* (L) are reduced compared with littermate embryos. The pancreatic epithelium is outlined in white in H and L. Counterstaining with DAPI was performed to reveal nuclei. Scale bars: 50  $\mu$ m.

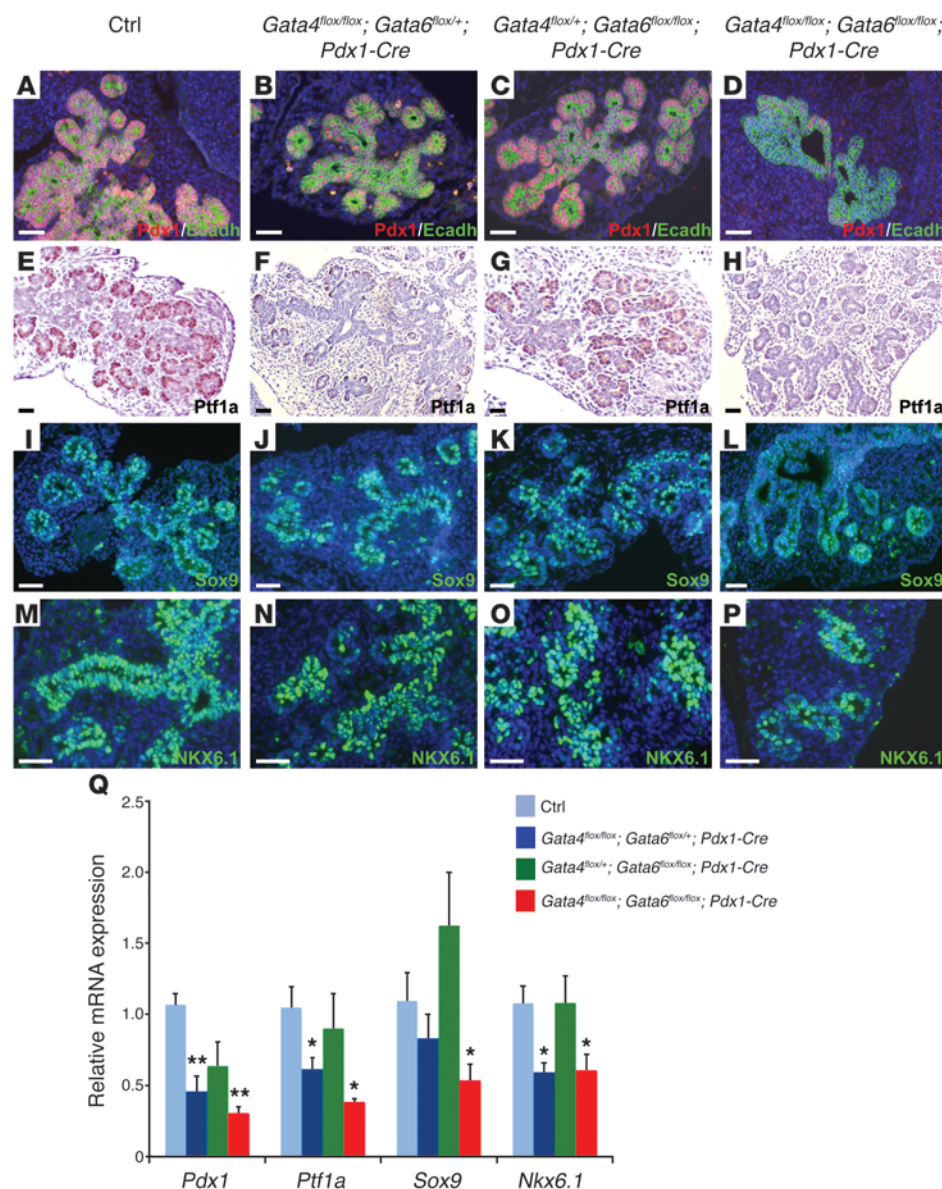
firmed using another proliferation marker, Ki67, a protein present during all active phases of the cell cycle. Based on Ki67 staining, a high percentage of proliferative pancreatic cells was found in control, *Gata4<sup>flox/flox</sup>;Gata6<sup>flox/+</sup>;Pdx1-Cre*, and *Gata4<sup>flox/+</sup>;Gata6<sup>flox/flox</sup>;Pdx1-Cre* littermate embryos (Figure 3, I–K, and N). In contrast, double-mutant mice showed a decreased number of Ki67-positive cells in the pancreatic epithelium compared with control mice (Figure 3, I, L, and N). Although not statistically significant, we also observed a decreasing trend in proliferation of pancreatic epithelial cells in *Gata4<sup>flox/flox</sup>;Gata6<sup>flox/+</sup>;Pdx1-Cre* embryos compared with control mice that might partially explain the hypoplastic phenotype of these mice at neonatal stages (Figure 3, F, J, M, and N). These results indicate that GATA4 and GATA6 are necessary for the normal proliferation rate of the pancreatic cells to sustain embryonic epithelial growth.

*Endocrine and exocrine differentiation is arrested in the absence of GATA4 and GATA6 activity.* Our previous results indicated that pancreatic epithelial growth and expansion were impaired in the absence of GATA4 and GATA6 function at E13.5. The epithelial remodeling that occurs during this period appears to be intimately connected to the formation of different progenitor domains in the progenitor ductal epithelium. Different pancreatic lineage progenitors display a characteristic distribution within the pancreatic epithelium at this embryonic stage (20). Multipotent progenitor cells are found at the tips of the branching pancreatic epithelium, while ductal-endocrine progenitor cells are located along the trunk (20–22). The tip and trunk domains can be easily identified by the expression of Carboxypeptidase A1 (*Cpa1*) and Neurogenin 3 (*Ngn3*), respectively (20, 23).

*Cpa1* and *Ngn3* expression were analyzed by immunohistochemistry to determine whether the establishment of different pancreatic cell lineages within MPCs was affected in double-mutant mice. As expected, cells stained for *Cpa1* were observed at the tips of the pancreatic epithelium, and *Ngn3*<sup>+</sup> cells were located in the epithelial trunk in control, *Gata4<sup>flox/flox</sup>;Gata6<sup>flox/+</sup>;Pdx1-Cre*, and *Gata4<sup>flox/+</sup>;Gata6<sup>flox/flox</sup>;Pdx1-Cre* embryos (Figure 4, A–C, and E–G). In stark contrast, the pancreatic epithelium of the double-mutant embryos lacked clear tip-trunk structures, and *Cpa1*<sup>+</sup> cells were totally absent in *Gata4/Gata6* mutant pancreatic epithelium (Figure 4D). Indeed, no clear acinar morphology could be observed in double-mutant pancreas by H&E staining (Figure 3D). Endocrine commitment was affected as well in double-mutant embryos, as only a low number of *Ngn3*-expressing cells were found in the epithelial trunk (Figure 4H). In concordance with this observation, the number of cells expressing the transcription factor *Nkx2.2*, an endocrine progenitor marker regulated by *Ngn3* (24), was also dramatically decreased in the double-mutant pancreata compared

with littermate embryos (Figure 4, I and L). Thus, differentiation of pancreatic multipotent progenitor cells toward acinar and endocrine lineages requires GATA4 and GATA6 function.

*GATA4 and GATA6 are required to maintain the pancreatic progenitor cell pool.* Exocrine and endocrine progenitors failed to form properly in *Gata4/Gata6* mutant mice, raising the question of whether MPC formation and/or identity might be affected as well. To test this hypothesis, we decided to analyze the expression of several transcription factors that define MPC identity, including *Pdx1*, *Ptf1a*, *Sox9*, and *Nkx6.1*, in double-mutant embryos at E13.5 (22, 23, 25, 26). MPCs of control and *Gata4<sup>flox/+</sup>;Gata6<sup>flox/flox</sup>;Pdx1-Cre* mice displayed normal distribution and expression levels of progenitor markers (Figure 5, A, C, E, G, I, K, M, and O). In contrast, the numbers of *Pdx1*-, *Ptf1a*-, *Sox9*-, and *Nkx6.1*-expressing cells in double-mutant embryos were dramatically reduced compared with control and *Gata4<sup>flox/+</sup>;Gata6<sup>flox/flox</sup>;Pdx1-Cre* littermate embryos (Figure 5, D, H, L, and P). The decrease of *Pdx1*- and *Ptf1a*-expressing cells was particularly remarkable, as only a few positive cells could be observed in the epithelium of the double-mutant embryos (Figure 5, D and H). The reduced pool of cells expressing MPC markers in double-mutant embryos led to an overall decrease in the expression of progenitor markers (Figure 5Q). A decrease in the number of cells expressing *Pdx1*, *Ptf1a*, and *Nkx6.1* was also found in *Gata4<sup>flox/flox</sup>;Gata6<sup>flox/+</sup>;Pdx1-Cre*, consistent with these mice displaying defects in pancreas formation at birth (Figure 5, B, F, J, and N). These results indicate that GATA4 and GATA6 activity are required to maintain normal numbers of MPCs during pancreatic development.

**Figure 5**

Reduced number of MPCs in *Gata4/Gata6* double-mutant mice. Control embryos show strong expression of all multipotent pancreatic progenitor markers, *Pdx1*, *Ptf1a*, *Sox9*, and *Nkx6.1* at E13.5 (A, E, I, and M, respectively). Similarly, *Gata4<sup>fllox/+</sup>; Gata6<sup>fllox/fllox</sup>; Pdx1-Cre* embryos display normal distribution and expression levels (C, G, K, and O). However, *Gata4<sup>fllox/fllox</sup>; Gata6<sup>fllox/+</sup>; Pdx1-Cre* mice show a significant decrease of cell numbers expressing *Pdx1*, *Ptf1*, and *Nkx6.1* (B, F, and N) and a moderate reduction in the number of *Sox9*<sup>+</sup> cells (J). The reduced number of cells expressing all pancreatic progenitor markers is even more dramatic in the double mutant (D, H, L, and P). (Q) qPCR analysis of multipotent pancreatic progenitor markers in E13.5 pancreata. \**P* < 0.02; \*\**P* < 0.001. Scale bars: 50  $\mu$ m.

*GATA4* and *GATA6* bind to 2 conserved GATA sites in the *Pdx1* promoter region. The impairment in pancreatic epithelial growth and cell differentiation observed in *Gata4/Gata6* mutant mice is reminiscent of that in *Pdx1*- and *Ptf1a*-null mice (25, 27). This observation, in combination with the dramatic reduction in the number of cells expressing both *Pdx1* and *Ptf1a* in the absence of *GATA4* and *GATA6* activity, prompted us to investigate whether GATA factors might regulate *Ptf1a* and *Pdx1* expression in pancreatic progenitors. Previous studies have identified a 5' distal enhancer region that controls the expression of *Ptf1a* in both dorsal and ventral pancreatic buds as early as E10.5 (28). Our bioinformatics analyses did not identify any conserved GATA site within these regulatory sequences, suggesting that the activity of this enhancer during pancreatic development might be independent of GATA factors. In spite of this, we cannot discard a role for GATA factors in the transcriptional regulation of *Ptf1a* through different regulatory sequences. Indeed, the relatively nonconserved proximal promoter contains several GATA sites that were able to bind recombinant

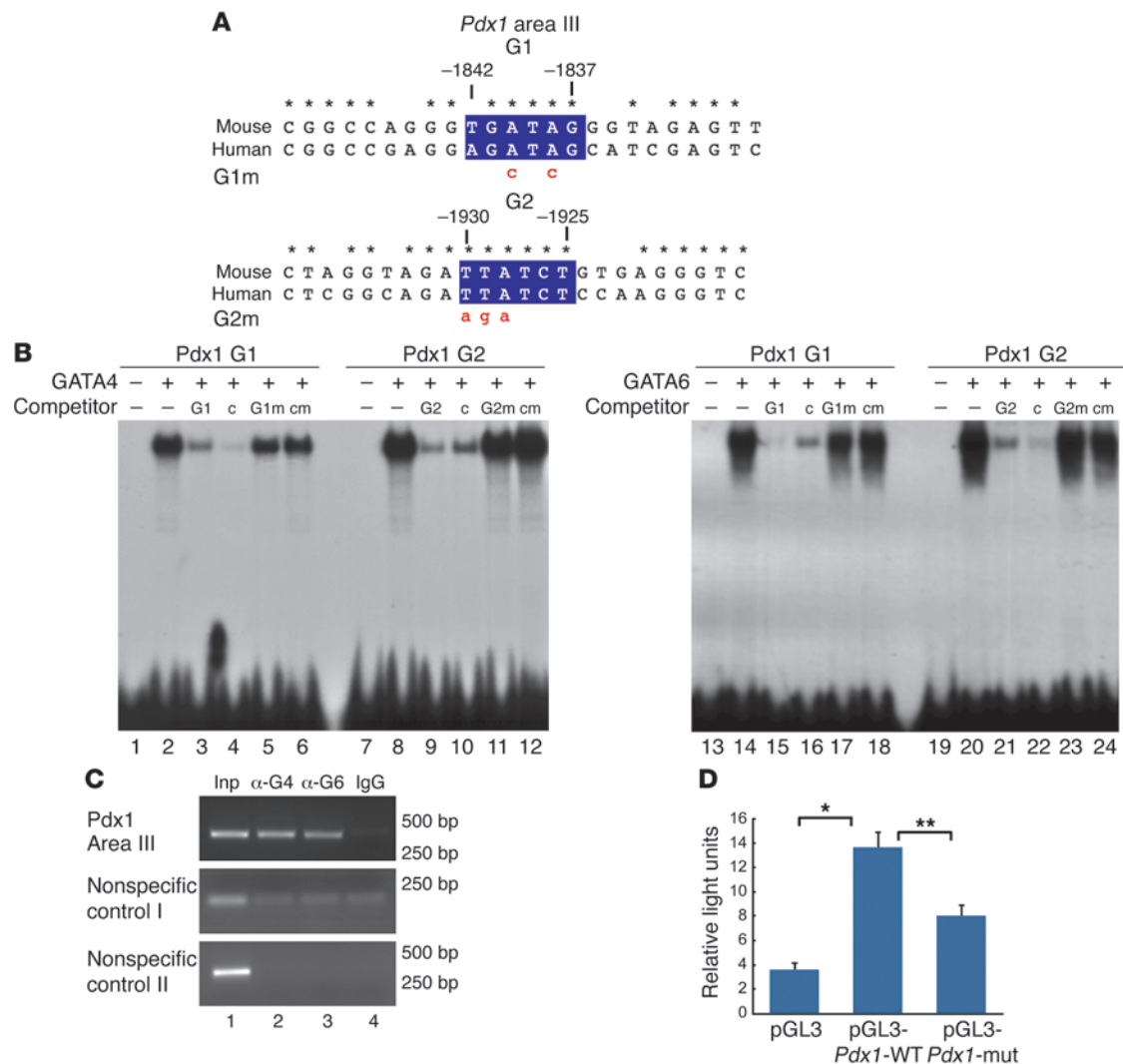
*GATA4* and *GATA6* proteins (Supplemental Figure 6). However, this region has only so far been associated with the transcriptional control of *Ptf1a* at later stages of pancreas development (28).

The transcriptional regulation of *Pdx1* has been extensively studied, and several regulatory sequences or enhancers in the 5' conserved region of the *Pdx1* promoter have been identified (29, 30). These enhancers, known as areas I, II, III, and IV, are bound by transcription factors, including HNF1a, Foxa2, Foxa1, HNF6, Pax6, MafA, and Ptf1, to direct *Pdx1* expression in pancreatic progenitors and/or in adult  $\beta$  cells (29, 31–37). Areas I and II direct *Pdx1* expression in pancreatic endocrine cells, but not exocrine cells, whereas the conserved area III controls the expression of *Pdx1* in pancreatic progenitor cells (37). With this consideration, we analyzed the conserved enhancer areas in the *Pdx1* locus for candidate GATA sites. Interestingly, 2 perfect and conserved candidate GATA-binding sites were found in area III of the previously identified *Pdx1* enhancer (Figure 6A). To determine whether these 2 putative sites, called G1 and G2, represent bona fide sites for GATA factors in the *Pdx1* enhancer,





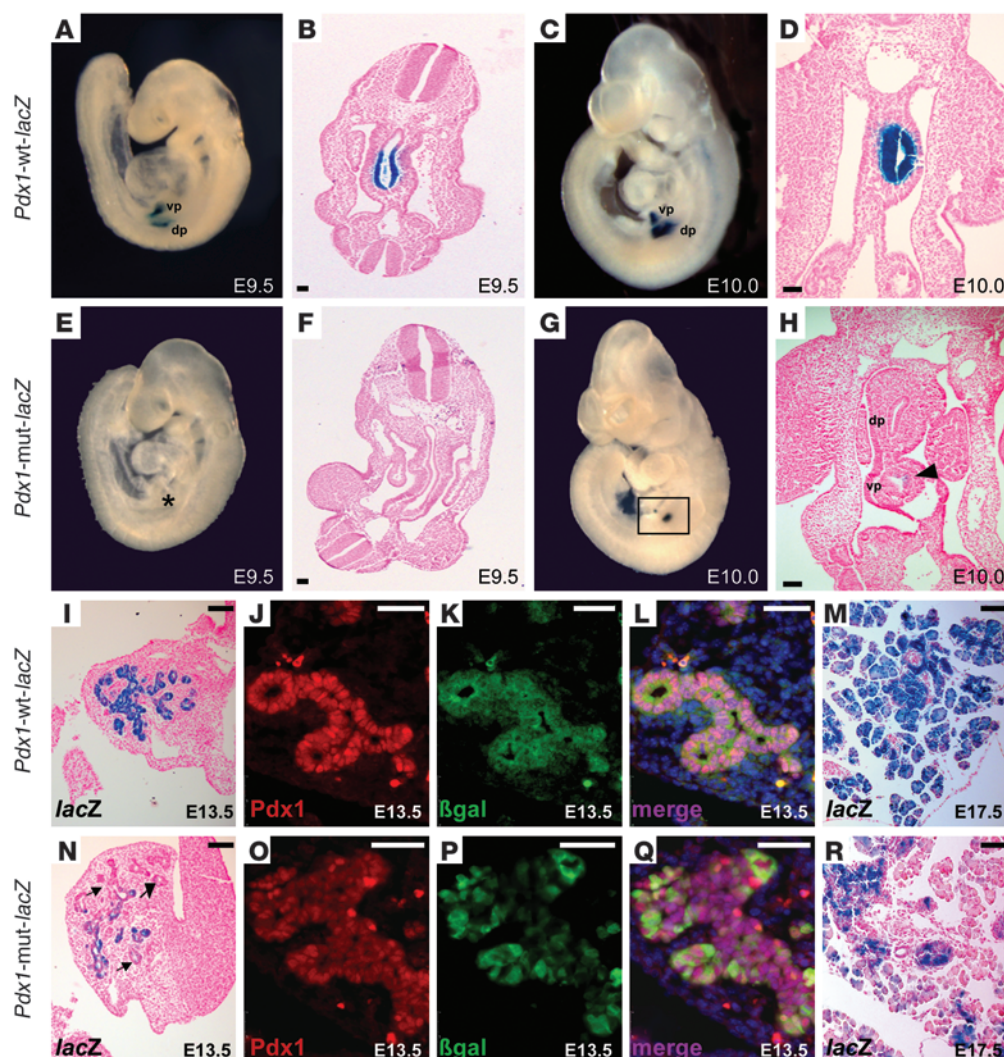
## research article

**Figure 6**

GATA4 and GATA6 bind to the *Pdx1* conserved area III in vitro and in pancreatic cell line. **(A)** Highly conserved region in the *cis*-regulatory area III of *Pdx1*. Two conserved GATA sites, as revealed by bioinformatics analysis, are shown in blue boxes. Numbers indicate the position of the GATA sites relative to the *Pdx1* translational start site. Point mutations introduced into GATA sites, G1m and G2m, are indicated in red lowercase. Asterisks denote nucleotides that have been perfectly conserved between mouse and human. **(B)** Recombinant GATA4 and GATA6 proteins are unable to bind to G1 and G2 GATA sites of the *Pdx1* enhancer as shown by EMSA. Competition experiments were performed by adding excess unlabeled probes of G1, G2, or control (denoted as c in competitor row) GATA sites, and the corresponding mutant versions (G1m, G2m, or cm) to the binding reaction. **(C)** ChIP experiments performed in mouse pancreatic ductal cells (mPAC cells) using specific GATA4 and GATA6 antibodies (lanes 2, 3, respectively) and nonspecific anti-IgG (lane 4) show that anti-GATA4 and anti-GATA6 antibodies are able to immunoprecipitate the GATA sites of the *Pdx1* conserved area III, but not nonspecific genomic regions. Lane 1 contains PCR products from input DNA (Inp) amplified prior to immunoprecipitation. Sizes of the PCR products in bp are shown on the right. **(D)** A WT *Pdx1* promoter-luciferase construct (pGL3-*Pdx1*-WT) is significantly activated by endogenous factors present in mPAC cells compared with the activity of the empty reporter pGL3 vector. Mutations in the GATA sites of *Pdx1* (pGL3-*Pdx1*-mut) significantly attenuate the luciferase activity. \* $P = 0.002$ ; \*\* $P = 0.005$ .

we assessed GATA4 and GATA6 protein binding (Figure 6B). First, we performed EMSA using recombinant proteins. Recombinant GATA4 protein bound efficiently to labeled oligos encompassing the *Pdx1* G1 and *Pdx1* G2 GATA sites (Figure 6B, lanes 2 and 8). The binding to G1 and G2 sites was specific, as it was competed off by excess, unlabeled self probe (Figure 6B, lanes 3 and 9) and by excess, unlabeled GATA control probe (Figure 6B, lanes 4 and 10). In contrast, binding of GATA4 to G1 and G2 sites was not competed off by unlabeled mutant versions of the G1 and G2 sites, G1m and

G2m (Figure 6, A and B, lanes 5 and 11), or GATA mutant control site (Figure 6B, lanes 6 and 12). Similarly to GATA4, recombinant GATA6 protein strongly bound to both G1 and G2 sites of the *Pdx1* enhancer (Figure 6B, lanes 14 and 20). This binding was specific, as it was competed off by an excess of unlabeled self probe (Figure 6B, lanes 15 and 21), but not by an excess of unlabeled mutant probes (Figure 6B, lanes 17 and 23). In addition, we found 2 conserved GATA sites in conserved area I that were able to bind GATA4 and GATA6 in EMSA experiments (Supplemental Figure 7), suggesting



**Figure 7**

Conserved GATA sites in area III are required for *Pdx1* enhancer activation in vivo. Whole-mount (A, C, E, and G) and transversal sections (B, D, F, and H) of representative *Pdx1*-WT-*lacZ* and *Pdx1*-mut-*lacZ* transgenic embryos stained with X-gal.  $\beta$ -gal activity in both dorsal and ventral pancreatic buds is first observed in *Pdx1*-WT-*lacZ* embryos at E9.5 (A and B). In contrast, no X-gal staining is observed in the pancreatic buds of *Pdx1*-mut-*lacZ* embryos (E and F, asterisk). By E10.0,  $\beta$ -gal activity in the *Pdx1*-mut-*lacZ* embryos (square in G, arrowhead in H) is dramatically reduced compared with *Pdx1*-WT-*lacZ* embryos (C and D). At E13.5, all the pancreatic epithelial cells in *Pdx1*-WT-*lacZ* embryos show homogeneous  $\beta$ -gal activity (I). Similarly, strong X-gal staining is observed in most of the pancreatic cells of *Pdx1*-WT-*lacZ* embryos at E17.5 (M). In contrast, *lacZ* expression is markedly reduced in the pancreatic epithelium of *Pdx1*-mut-*lacZ* embryos both at E13.5 (arrows in N) and at E17.5 (R). Immunofluorescence staining at E13.5 reveals a complete overlapping expression pattern of *Pdx1* and  $\beta$ -gal in *Pdx1*-WT-*lacZ* pancreas (J–L), while only a fraction of *Pdx1*<sup>+</sup> cells express  $\beta$ -gal in *Pdx1*-mut-*lacZ* embryos (O–Q). dp, dorsal pancreas; vp, ventral pancreas. Scale bars: 50  $\mu$ m.

that other GATA sites may also participate in the transcriptional regulation of *Pdx1* at later stages of pancreas development.

To investigate whether GATA4 and GATA6 could bind to conserved area III of the *Pdx1* cis-regulatory sequences in pancreatic cells, we performed a ChIP assay in a murine pancreatic ductal cell line, mPAC, that endogenously expresses GATA4, GATA6, and PDX1 (data not shown). Anti-GATA4 antibody was able to specifically immunoprecipitate DNA fragments encompassing the G1 and G2 sites of the *Pdx1* conserved area III, but not nonspecific genomic regions (Figure 6C, lane 2). Incubation of sheared DNA with anti-GATA6 also resulted in specific immunoprecipitation of DNA fragments containing the GATA sites of the *Pdx1* enhancer (Figure 6C,

lane 3). The addition of nonspecific IgG to the reaction did not result in the immunoprecipitation of the *Pdx1* conserved area III or nonspecific genomic regions (Figure 6C, lane 4), confirming the specificity of the immunoprecipitation by the corresponding GATA antibodies. These results demonstrate that endogenous GATA4 and GATA6 bind to the GATA sites in the endogenous *Pdx1* enhancer.

The observation that GATA4 and GATA6 bound to the *Pdx1* conserved area III by EMSA and in mPAC pancreatic cells suggests that GATA4 and GATA6 transcription factors are required to transcriptionally regulate *Pdx1* expression. Therefore, we examined the requirement of the G1 and G2 sites to activate the *Pdx1* promoter in mPAC cells. A reporter construct containing the conserved area



## research article

III of *Pdx1* was fused to the luciferase gene to generate the pGL3-*Pdx1*-WT reporter plasmid. Likewise, the 2 conserved GATA sites were mutated to generate the pGL3-*Pdx1*-mut reporter plasmid. The luciferase activity of these plasmids was measured in transiently transfected mPAC cells. mPAC cells transfected with pGL3-*Pdx1*-WT display significantly higher luciferase activity compared with mPAC cells transfected with the parent reporter vector pGL3-basic, indicating that the *Pdx1* enhancer region is activated by endogenous factors in mPAC cells (Figure 6D). Activation of the *Pdx1* promoter significantly decreased when the 2 GATA sites in area III were mutated (Figure 6D). Taken together, these results demonstrate that GATA factors are required for the transcriptional regulation of *Pdx1* in at least some pancreatic cell lines in vitro, suggesting that they may function through these sites in the MPCs.

*Pdx1* transcriptional activity depends on GATA sites in vivo. Previous studies have reported that a region 4.6 kb upstream of the *Pdx1* translational start site containing conserved areas I, II, and III is sufficient to faithfully recapitulate endogenous *Pdx1* expression throughout development in transgenic mice (38, 39). We generated transgenic mice harboring these upstream sequences of the *Pdx1* promoter fused to the *lacZ* reporter gene, which we refer to as *Pdx1*-WT-*lacZ*. To test the requirement of the GATA sites for the *Pdx1* enhancer activity in vivo, we introduced mutations in the GATA sites of *Pdx1* area III to generate the *Pdx1*-mut-*lacZ* transgene. The introduced mutations were identical to those used in EMSA analyses that abolished the binding of GATA4 and GATA6 recombinant proteins (Figure 6, A and B). We generated 3 stable transgenic lines for the *Pdx1*-WT-*lacZ* construct and 2 stable transgenic lines for the *Pdx1*-mut-*lacZ* construct. The analysis of the *lacZ* expression by X-gal staining was performed in at least 6 transgenic embryos from each founder at different developmental stages. We observed that the *lacZ* expression pattern of the transgenic embryos was temporally and spatially very consistent among the founders from each construct. As expected, the 4.6 kb *cis*-regulatory region was sufficient to recapitulate the endogenous expression of *Pdx1* in transgenic embryos from early embryonic stages. At E9.5,  $\beta$ -gal activity was observed in both the dorsal and ventral pancreatic buds in *Pdx1*-WT-*lacZ* transgenic embryos (Figure 7, A and B). In contrast, no X-gal staining was observed in any *Pdx1*-mut-*lacZ* transgenic embryo (Figure 7, E and F). By E10.0, very robust X-gal staining was observed in the pancreatic foregut of *Pdx1*-WT-*lacZ* transgenic embryos (Figure 7, C and D), while only a few *lacZ*-positive cells were detected in the pancreatic epithelium of *Pdx1*-mut-*lacZ* embryos (Figure 7, G and H). At midgestation, around E13.5, the *Pdx1*-WT-*lacZ* transgene continued to be active in the branching epithelial tree of the pancreas (Figure 7I). The  $\beta$ -gal expression directed by the *Pdx1*-WT-*lacZ* transgene completely mirrored the endogenous expression of *Pdx1* (Figure 7, J–L). In sharp contrast, mutations in *Pdx1* area III GATA sites resulted in a dramatic decrease in the *Pdx1*-mut-*lacZ* transgene activity in the pancreatic epithelium (Figure 7N). Immunohistochemical analysis confirmed the reduction of  $\beta$ -gal expression in *Pdx1*-mut-*lacZ* embryos (Figure 7, O–Q). At later stages of development, the activity of the *Pdx1*-mut-*lacZ* transgene was even more diminished compared with the activity of the *Pdx1*-WT-*lacZ* transgene (Figure 7M). Furthermore, X-gal staining was observed only in scattered cells of *Pdx1*-mut-*lacZ* pancreatic embryos (Figure 7R). These results indicate that GATA sites are required for *Pdx1* enhancer activity during pancreas development and place GATA factors upstream of *Pdx1* in the regulatory network controlling pancreas formation.

## Discussion

Pancreas specification and differentiation follow a well-orchestrated cascade of transcription factors that control the pancreatic genetic program in a spatiotemporal fashion. Inactivation of several of these transcription factors results in pancreatic hypoplasia or pancreatic agenesis in humans and mice (26, 27, 40, 41), reflecting their critical role in pancreas formation. In the rare examples of patients with pancreatic agenesis in which the affected gene has been identified, neonatal diabetes mellitus has been associated with homozygous mutations in the coding region of *PDX1* and *PTF1A* genes (42, 43).

More recently, heterozygous mutations in *GATA6* have been found in neonatal diabetic patients associated with pancreas agenesis and other extrapancreatic disorders, suggesting a possible functional role of this gene in human pancreas formation (8). In agreement with these observations, our studies performed in mice have established the GATA family transcription factors as critical regulators of pancreatic development. In contrast with humans, single inactivation of *Gata6* (or *Gata4*) in the mouse pancreatic progenitor cells does not have an obvious effect on pancreas formation. The discrepancy between human and mouse GATA6 function could be related to the previously suggested role for GATA transcription factors in earlier pancreas specification (9). GATA6 mutations in humans could cause a failure in endoderm specification toward pancreatic fate, resulting in pancreas agenesis. Gene inactivation by *Pdx1*-directed Cre expression in *Gata6* mutant mice is achieved after the pancreas has been specified, and therefore it can be argued that a possible role for GATA6 (or GATA4) in pancreas specification was not addressed in our study. However, inactivation of *Gata4* and *Gata6* in the prepancreatic endoderm using the *FoxA3*-Cre line results in proper pancreatic specification, suggesting that GATA factors might not be required to initiate the pancreatic program (44). The discrepancy between the mouse and human phenotype of GATA6 deficiency might also be explained by differences in the pancreatic genetic program between species. The spatiotemporal pattern of GATA factor expression during human pancreas development has not been reported. Thus, it remains to be determined whether GATA4 and GATA6 expression overlap and are functionally redundant in early human pancreatic formation, as is true in the mouse.

Based on the overlapping expression of GATA4 and GATA6 in identical cell compartments of different tissues during mouse embryonic development and their ability to recognize the same binding sites in the regulatory sequences of target genes, a certain degree of functional redundancy between these 2 transcription factors could have been anticipated. For example, at the onset of cardiac development, GATA4 and GATA6 are coexpressed, and thus, it was not entirely unexpected when functional studies in mice showed that GATA4 and GATA6 had redundant roles in controlling cardiomyocyte cell differentiation (45). More recently, it has been reported that GATA4 and GATA6 also share common functions in regulating cell proliferation and differentiation in proximal intestinal cells (46). Similar to these studies, our results indicate that these 2 GATA transcription factors are also functionally complementary during early stages of pancreas formation.

The pancreatic agenesis phenotype of the *Gata4*/*Gata6* mutant mice is the result of defects that occur during the early stages of pancreas formation. We have observed defects in pancreatic epithelial morphology of double-mutant mice as early as E13.5. At that developmental stage, there is a marked reduction in the number of proliferating epithelial cells. Xuan et al. have reported that cell proliferation is decreased even at earlier embryonic stages in *Gata4*/*Gata6* mutant mice, indicating that GATA4 and GATA6





function is required from the early post-bud stages of pancreas development (44). The exact mechanism by which the loss of GATA4 and GATA6 results in arrested pancreatic development needs to be investigated. However, it is tempting to speculate that a critical number of pancreatic progenitors are required to ensure the progression of the developmental program. Thus, diminishing the size of the pancreatic progenitor pool (as in *Gata4/Gata6* mutant mice) could compromise the ability to move forward in the organogenesis program and ultimately result in the loss of pancreatic mass after birth. An attractive model for the expansion of MPCs would involve GATA, Pdx1, Ptf1a, and likely other early pancreatic transcription factors working in a cross-regulatory network to engage the proper level of progenitor cell proliferation necessary to promote the progression of pancreas organogenesis.

Although several transcription factors have been identified for controlling *Pdx1* expression in adult  $\beta$  cells, less is known about the transcription factors that directly regulate the expression of *Pdx1* in the early stages of pancreas development. Hnf6, Ptf1a, and more recently, FoxA1/FoxA2 have been identified as direct regulators of early *Pdx1* expression (35, 37, 41). Our in vivo transgenic analysis adds GATA factors to the short list of identified transcription factors that control *Pdx1* expression during early pancreatic development. The 2 conserved GATA sites we identified in our studies are located in area III of the *Pdx1* regulatory sequence, an area that has been proposed to mediate early, pancreas-wide *Pdx1* expression (37). Consistent with this, these GATA sites are required for *Pdx1* expression in the early pancreatic bud. Interestingly, they seem to be required for maintenance of *Pdx1* expression at later stages of pancreatic formation as well. However, these mutations do not completely abolish *Pdx1* expression, and thus it is possible that additional GATA sites might account for the lower  $\beta$ -gal activity observed in *Pdx1*-mut-*lacZ* transgenic embryos.

An interesting observation from our analyses of different combinations of *Gata4* and *Gata6* floxed alleles is that, although both transcription factors are required for proper pancreas formation, GATA4 is more competent than GATA6 in supporting pancreas development. *Gata4*<sup>fllox/+</sup>; *Gata6*<sup>fllox/fllox</sup>; *Pdx1*-Cre mutant pancreata appear completely normal. In contrast, although a pancreas is formed in *Gata4*<sup>fllox/fllox</sup>; *Gata6*<sup>fllox/+</sup>; *Pdx1*-Cre mutant mice, a severe loss of pancreatic acinar mass and disrupted pancreatic morphology is observed. The more severe phenotype observed in *Gata4*<sup>fllox/fllox</sup>; *Gata6*<sup>fllox/+</sup>; *Pdx1*-Cre embryos compared with the single *Gata4*-knockout mice suggests that GATA6 might also contribute to exocrine development before its expression becomes restricted to islet and ductal cells. The partial redundancy of GATA4 and GATA6 indicates that they have common and distinct functions in regulating gene expression during pancreatic development. It will be interesting to determine whether different DNA-binding affinities or recruitment of specific coactivators might explain the differences in GATA4 and GATA6 activities in pancreas development.

In summary, we have demonstrated a critical role for GATA4 and GATA6 transcription factors in pancreas formation. Our results place GATA factors at the top of the transcriptional network hierarchy controlling pancreas organogenesis. The direct regulation of *Pdx1* expression by GATA factors offers a model that explains the pathogenesis of congenital pancreatic anomalies in human. Advances in our current understanding of pancreatic islet formation have sparked a great interest in the development of cell-based therapies for diabetes. Our data here suggest that manipulation of GATA factor activities should be now considered when devising strategies to generate  $\beta$  cells, either in vitro or in vivo.

## Methods

**Mice.** *Gata4*<sup>fllox/fllox</sup>, *Gata6*<sup>fllox/fllox</sup>, and *Pdx1*-Cre mice have been previously described (14, 15, 23, 47). The strategy for genotyping *Gata6* WT and floxed alleles has been previously described (47). *Gata4* WT and floxed alleles were detected by PCR using the following primers: 5'-CCCAGTAAAGAAGTCAGCACAAAGGAAAC-3' and 5'-AGACTATTGATCCCGGAGTGAACATT-3'. Cre transgene was detected by PCR using the following primers: 5'-TGCCACGACCAAGTGA-CAGC-3' and 5'-CCAGGTTACGGATATAGTTCATG-3'.

**Reporter transgenic constructs.** A 4,660-bp *SpeI/EcoRV* fragment containing 4620 bp upstream and 40 bp downstream of the transcriptional start site from the mouse *Pdx1* promoter region was cloned into *SpeI-SmaI* sites of the AUG- $\beta$ -gal *lacZ* reporter plasmid (48) to generate the *Pdx1-lacZ* transgene. GATA site mutations in the *Pdx1* promoter (*Pdx1*-mut) were generated by PCR using the following plus strand sequence: G1m, 5'-CCACTAGGTAGAAGATCTGTGAGGGTCAACAC-3'; G2m, 5'-CACTC-GCGGCCGAGGAGCTCGCATCGAGTCCTGGC-3'. Mutagenesis was confirmed by sequencing on both strands.

*Pdx1*-WT-*lacZ* and *Pdx1*-mut-*lacZ* transgenic reporter fragments were excised from the plasmid backbone with *SpeI/HindIII*, gel purified, and suspended in 10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA (pH 7.4), for pronuclear injection as described previously (49). Injected embryos were implanted into pseudo-pregnant FVB females, and embryos were allowed to develop to adulthood for establishment of stable transgenic lines. Three stable transgenic lines harboring the *Pdx1*-WT-*lacZ* construct and 2 stable transgenic lines harboring the *Pdx1*-mut-*lacZ* construct were generated. Each transgenic line was bred to C57BL/6 WT mice, and the embryos or tissues from these crosses were stained with X-gal to visualize  $\beta$ -gal, as described previously (50).

**Histology, immunohistochemistry, and immunofluorescence.** Whole embryos or dissected pancreata collected at embryonic or adult stages were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS overnight at 4°C, dehydrated with ethanol and xylene, and embedded in paraffin. Sections were cut at a thickness of 6  $\mu$ m with a Leica DM6000B microtome. Sections were dewaxed through a series of xylene and ethanol washes. Embryos or tissues were counterstained with Nuclear Fast Red or H&E to visualize structures as previously described (49, 51). Prior to incubation with antibodies, paraffin sections were treated for immunohistochemistry and immunofluorescence as described previously (52).

The following primary antibodies were used at the indicated dilutions: mouse anti-GATA4 (1:100; Sc-25310, Santa Cruz Biotechnology Inc.); rabbit anti-GATA6 (1:50; Sc-9055, Santa Cruz Biotechnology Inc.); guinea pig anti-Pdx1 (1:200; ab47308, Abcam); rabbit anti-Sox9 (1:800; AB5535, Millipore); mouse anti-E-cadherin (1:100; 610186, BD Biosciences); mouse anti-amy-lase (1:200; Sc-46657, Santa Cruz Biotechnology Inc.); hamster anti-mucin (1:300; HM-1630, Thermo Scientific), rabbit anti- $\beta$ -gal (1:500; 559762, MP Biochemicals); rabbit anti-Ki67 (1:100; RM-9106-S, Thermo Scientific); rabbit anti-phospho-histone H3 (1:500; 06-570, Millipore); biotinylated DBA (1:300; B-1035, Vector Laboratories); rabbit anti-carboxypeptidase 1 (1:800; 1810-0006, AbD Serotec); rabbit anti-Ptf1a (1:2000; AB2153 [ref. 53], Beta Cell Biology Consortium), rabbit anti-glucagon (1:200; 2760, Cell Signaling), and mouse anti-insulin (1:500; I2018, Sigma-Aldrich). The following primary antibodies were obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB) developed under the auspices of the National Institute of Child Health and Human Development (NICHD) and maintained by The University of Iowa, Department of Biology, Iowa City, Iowa, USA: mouse anti-Ngn3 (1:200; DSHB, F25A1B3, developed by Ole D. Madsen, Hagedorn Research Institute, Gentofte, Denmark); rat anti-cytokeratin 19 (1:200; DSHB, TROMA III, developed by Rolf Kemler, Max-Planck Institute of Immunobiology and Epigenetics, Freiburg, Germany); mouse anti-Nkx2.2 (1:25; DSHB, 74.SA5, developed by Thomas M. Jessell and Susan Brenner-Morton, Columbia University, New York, New York, USA); mouse anti-Nkx6.1 (1:50; DSHB,





## research article

F55A10, developed by Ole D. Madsen). Rabbit, rat, guinea pig, hamster, and mouse Alexa Fluor 568 and Alexa Fluor 488 (Invitrogen) secondary antibodies were used at 1:300 dilutions. For Nkx6.1 staining, signal from the secondary antibody was amplified using the TSA Fluorescein System (PerkinElmer). Counterstaining with DAPI was performed to visualize nuclei. The slides were analyzed using epifluorescence microscopy (Leica AF6000). Immunoperoxidase staining for the peroxidase substrate diaminobenzidine (DAB) was performed using the Vectastain Elite ABC Kit (Vector Laboratories).

**EMSA.** DNA-binding reactions were performed as described previously (54). *Gata4* and *Gata6* cDNAs were transcribed and translated using the TNT Coupled Transcription-Translation System (Promega) as described in the manufacturer's directions. GATA4 and GATA6 proteins were generated from pCITE-GATA4 and pCITE-GATA6 plasmids, which have been described previously (55). The sense strand sequence of the mouse *Pdx1* GATA sites used for EMSA were as follows: G1, 5'-GGGCCACTAGGTAGATTATCTGTGAGGGTCAACAC-3'; G2, 5'-GGACTCGCGCCGAGGAGATAGCATC-GAGTCCCTGGC-3'; G3-G4, 5'-GGGTACCTCCAGTATCAGGGAGGAC-TATCAGGACGTCC-3'. Control and mutant control oligos for GATA sites have previously been described (55). The sense strand sequences for the G1 and G2 Gata mutant sites (G1m and G2m) were the same as for the mutagenic primers described above, and for G3m-G4m, the sequence was as follows: 5'-GTACCTCCAGGATCCGGGAAGACTCTCAGGACG-3'.

The sense strand sequences of the mouse *Ptf1a* GATA sites used for EMSA were as follows: G1, 5'-GGCATCAGGATTTTGATAAGGTTTTGAAATTTGG-3'; G1m, 5'-CATCAGGATTTTGCCCGGGTTTTGAAATTTGG-3'; G2-G3, 5'-GCACTTATTTGGATAATTATATCAGCATTTAGG-3'; G2m-G3m, 5'-CACTTATTTGGTATAATCGATCAGCATTTAGG-3'.

**ChIP.** ChIP assays were performed using Dynabeads Protein A (100.01D, Invitrogen) following the recommendations of the manufacturer, with some modifications. Briefly, mPAC mouse pancreatic cells were grown in DMEM supplemented with 10% FBS on a 10-cm plate to approximately  $1.5 \times 10^6$  cells (56). At that density, cells were treated with 1% formaldehyde at 37°C for 10 minutes to crosslink protein-DNA complexes. Sheared DNA from mPAC cells was incubated with Dynabeads Protein A plus 4 µg of mouse anti-GATA4 antibody (Sc-25310, Santa Cruz Biotechnology Inc.) or rabbit anti-GATA6 antibody (Sc-9055, Santa Cruz Biotechnology Inc.) for 1 hour at 4°C. The same amount of mPAC sheared DNA was incubated with 4 µg of nonspecific IgG as a negative control. The DNA fragments were collected after the incubation using a DynaMag-2 (123.21D, Invitrogen). Following incubation in 200 mM NaCl at 65°C overnight to reverse the crosslinks, the DNA was recovered by phenol-chloroform extraction and subjected to PCR. The following primers were used to detect the fragment encompassing both GATA sites of the *Pdx1* promoter: 5'-TGACCAGGTGAAGGAAGGTCC-3' and 5'-AGCCACCTGTGCCCCGTCAGG-3'. The primers used to detect the second exon of *Cyclin D2* as nonspecific control have previously been described (54). The following primers were used to detect the 3' UTR region of *Pdx1* as nonspecific control II: 5'-CTTTCTG-GATGCTGCTCACAG-3'; 5'-TAATGTAGATTGTCTCATCC-3'.

**Luciferase reporter plasmids, cell culture, and transfection.** A 1,927-bp fragment containing 1,886 bp upstream and 41 bp downstream of the transcriptional start site from the mouse *Pdx1* promoter region with either the WT GATA sequences or the GATA mutations, described above, was cloned in the pGL3-basic reporter vector (Promega) to generate pGL3-*Pdx1*-WT or pGL3-*Pdx1*-mut reporter plasmids. mPAC cells were maintained in DMEM supplemented with 10% FBS. Cells were cultured in 24-well plates at a density of 80,000 cells per well and transfected using Lipofectamine 2000 (Promega) following the manufacturer's recommendations. Each well was transfected with 0.5 µg of pGL3-basic, pGL3-*Pdx1*-WT, or pGL3-*Pdx1*-mut reporter plasmids. The firefly luciferase activity was normalized to renilla luciferase activity by cotransfecting each well with 5 ng of pRL-renilla reporter vector (Promega).

Cells were harvested 48 hours after transfection, and the luciferase activity was measured using a Dual Luciferase Kit Assay (Promega) and detected in a luminometer (Glomax 20/20, Promega). At least 3 independent triplicate sets of transfections were performed with each construct.

**Quantitative RT-PCR.** Dissected pancreata from 3 E13.5 embryos of control (*Pdx1-Cre*), *Gata4<sup>fllox/fllox</sup>;Gata6<sup>fllox/+</sup>;Pdx1-Cre*, *Gata4<sup>fllox/+</sup>;Gata6<sup>fllox/fllox</sup>;Pdx1-Cre*, and *Gata4<sup>fllox/fllox</sup>;Gata6<sup>fllox/fllox</sup>;Pdx1-Cre* mice were pooled to obtain RNA. Total RNA was isolated using RNeasy Plus Micro Kit (74034, QIAGEN), and cDNA was prepared using QuantiTect Reverse Transcription Kit (205311, QIAGEN). Quantitative PCR (qPCR) analysis was performed using FastStart Universal SYBR Green Master (04913850001, Roche), and the following primers were used: *Ptf1a* F, 5'-GCACTCTCTTCCTG-GACTGA-3'; *Ptf1a* R, 5'-TCCACACTTTAGCTGTACGGA-3'; *Pdx1* F, 5'-AGCTCCCTTTCCCGTGGATGAAAT-3'; *Pdx1* R, 5'-TAGGCAGTAC-GGGTCTCTTGTTT-3'; *Nkx2.2* F, 5'-TCGCTCTCCCCTTTGAACTTT-3'; *Nkx2.2* R, 5'-GTAAACGTTGGGATGGTTTGG-3'; *Sox9* F, 5'-GCAGAC-CAGTACCCGCATCT-3'; *Sox9* R, 5'-TTCAGCAGCCTCCAGAGCTT-3';  $\beta$ -actin F, 5'-TCCTGTGGCATCCACGAACTACA-3';  $\beta$ -actin R, 5'-ACCAGACAGCACTGTGTTGGCATA-3'. For detection of *Pdx1*, *Ptf1*, *Sox9*, and *Nkx6.1*, 10 ng of total cDNA was used per reaction, and each reaction was done in triplicate in 3 independent experiments. Gene expression levels were normalized to  $\beta$ -actin. The gene expression changes in mutant mice were determined using the comparative  $\Delta\Delta C_t$  method (57).

**Quantitation of proliferative cells.** The number of proliferating cells were determined by counting phospho-histone H3- or Ki67-labeled cells within the pancreatic epithelium, delimited by E-cadherin<sup>+</sup> cells, in a series of sections from at least 3 pancreatic embryos of each genotype: control, *Gata4<sup>fllox/fllox</sup>;Gata6<sup>fllox/+</sup>;Pdx1-Cre* (4KO/6Het), *Gata4<sup>fllox/+</sup>;Gata6<sup>fllox/fllox</sup>;Pdx1-Cre* (4Het/6KO), and *Gata4<sup>fllox/fllox</sup>;Gata6<sup>fllox/fllox</sup>;Pdx1-Cre* (4KO/6KO).

**Statistics.** All values are expressed as mean  $\pm$  SEM. Statistical analyses were performed using a 2-tailed Student's *t* test. *P* < 0.05 was considered statistically significant.

**Study approval.** All experiments using animals complied with institutional guidelines and were reviewed and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) of the University of Sevilla, Sevilla, Spain.

## Acknowledgments

We thank David Cano, Benoit Gauthier, and Janet Lau for their helpful comments on the manuscript. We also thank Antonio Cárdenas and Raquel Araujo for their technical assistance and María del Pilar González Sánchez and Ana Morilla Camacho from CPYEA for the generation of transgenic mice. We also thank Paloma Domínguez (CABIMER) for her assistance with the confocal microscope. M. Carrasco was supported by a predoctoral fellowship from the Spanish Ministry of Education. I. Delgado was supported by a contract from Consejería de Salud, Junta de Andalucía (PI-0008). This work was supported by grants from ISCIII cofunded by Fondos FEDER (PI08/0018, PI11/01125 to A. Rojas) (RD06/0010/0025 and PI10/00964 to B. Soria), Consejería de Economía, Innovación y Ciencia (P10.CTS.6505 to B. Soria), and from Consejería de Salud, Junta de Andalucía (PI-0008/2009 to A. Rojas) (PI-022/2008 to F. Martín).

Received for publication February 14, 2012, and accepted in revised form July 12, 2012.

Address correspondence to: Anabel Rojas, Avda. Americo Vespucio s/n., Parque Científico, Isla de la Cartuja, 41092 Sevilla, Spain. Phone: 34.954.467.427; Fax: 34.954.461.664; E-mail: [anabel.rojas@cabimer.es](mailto:anabel.rojas@cabimer.es).



1. Patient RK, McGhee JD. The GATA family (vertebrates and invertebrates). *Curr Opin Genet Dev*. 2002; 12(4):416–422.
2. Bresnick EH, Lee HY, Fujiwara T, Johnson KD, Keles S. GATA switches as developmental drivers. *J Biol Chem*. 2010;285(41):31087–31093.
3. Molkentin JD. The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, and -6. Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression. *J Biol Chem*. 2000;275(50):38949–38952.
4. Garg V, et al. GATA4 mutations cause human congenital heart defects and reveal an interaction with TBX5. *Nature*. 2003;424(6947):443–447.
5. Lin X, et al. A novel GATA6 mutation in patients with tetralogy of Fallot or atrial septal defect. *J Hum Genet*. 2010;55(10):662–667.
6. Maitra M, Koenig SN, Srivastava D, Garg V. Identification of GATA6 sequence variants in patients with congenital heart defects. *Pediatr Res*. 2010; 68(4):281–285.
7. Kodo K, Yamagishi H. GATA transcription factors in congenital heart defects: a commentary on a novel GATA6 mutation in patients with tetralogy of Fallot or atrial septal defect. *J Hum Genet*. 2010; 55(10):637–638.
8. Allen HL, et al. GATA6 haploinsufficiency causes pancreatic agenesis in humans. *Nat Genet*. 2011; 44(1):20–22.
9. Decker K, Goldman DC, Grasch CL, Sussel L. Gata6 is an important regulator of mouse pancreas development. *Dev Biol*. 2006;298(2):415–429.
10. Ketola I, et al. Transcription factor GATA-6 is expressed in the endocrine and GATA-4 in the exocrine pancreas. *Mol Cell Endocrinol*. 2004; 226(1–2):51–57.
11. Kuo CT, et al. GATA4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and heart tube formation. *Genes Dev*. 1997;11(8):1048–1060.
12. Molkentin JD, Lin Q, Duncan SA, Olson EN. Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis. *Genes Dev*. 1997;11(8):1061–1072.
13. Koutsourakis M, Langeveld A, Patient R, Bedington R, Grosfeld F. The transcription factor GATA6 is essential for early extraembryonic development. *Development*. 1999;126(9):723–732.
14. Watt AJ, Zhao R, Li J, Duncan SA. Development of the mammalian liver and ventral pancreas is dependent on GATA4. *BMC Dev Biol*. 2007;7:37.
15. Hingorani SR, et al. Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell*. 2003;4(6):437–450.
16. Zhang Y, et al. A Gata6-Wnt pathway required for epithelial stem cell development and airway regeneration. *Nat Genet*. 2008;40(7):862–870.
17. Oka T, et al. Cardiac-specific deletion of Gata4 reveals its requirement for hypertrophy, compensation, and myocyte viability. *Circ Res*. 2006; 98(6):837–845.
18. Jorgensen MC, Ahnfelt-Ronne J, Hald J, Madsen OD, Serup P, Hecksher-Sorensen J. An illustrated review of early pancreas development in the mouse. *Endocr Rev*. 2007;28(6):685–705.
19. Pan FC, Wright C. Pancreas organogenesis: from bud to plexus to gland. *Dev Dyn*. 2011;240(3):530–565.
20. Zhou Q, Law AC, Rajagopal J, Anderson WJ, Gray PA, Melton DA. A multipotent progenitor domain guides pancreatic organogenesis. *Dev Cell*. 2007; 13(1):103–114.
21. Solar M, et al. Pancreatic exocrine duct cells give rise to insulin-producing beta cells during embryogenesis but not after birth. *Dev Cell*. 2009;17(6):849–860.
22. Schaffer AE, Freude KK, Nelson SB, Sander M. Nkx6 transcription factors and Ptf1a function as antagonistic lineage determinants in multipotent pancreatic progenitors. *Dev Cell*. 2010;18(6):1022–1029.
23. Gu G, Dubauskaite J, Melton DA. Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development*. 2002;129(10):2447–2457.
24. Watada H, Scheel DW, Leung J, German MS. Distinct gene expression programs function in progenitor and mature islet cells. *J Biol Chem*. 2003; 278(19):17130–17140.
25. Kawaguchi Y, Cooper B, Gannon M, Ray M, MacDonald RJ, Wright CV. The role of the transcriptional regulator Ptf1a in converting intestinal to pancreatic progenitors. *Nat Genet*. 2002;32(1):128–134.
26. Seymour PA, et al. From the Cover: SOX9 is required for maintenance of the pancreatic progenitor cell pool. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104(6):1865–1870.
27. Jonsson J, Ahlgren U, Edlund T, Edlund H. IPF1, a homeodomain protein with a dual function in pancreas development. *Int J Dev Biol*. 1995;39(5):789–798.
28. Masui T, Swift GH, Hale MA, Meredith DM, Johnson JE, MacDonald RJ. Transcriptional autoregulation controls pancreatic Ptf1a expression during development and adulthood. *Mol Cell Biol*. 2008; 28(17):5458–5468.
29. Gerrish K, et al. Pancreatic beta cell-specific transcription of the pdx-1 gene. The role of conserved upstream control regions and their hepatic nuclear factor 3beta sites. *J Biol Chem*. 2000;275(5):3485–3492.
30. Gerrish K, Van Velkinburgh JC, Stein R. Conserved transcriptional regulatory domains of the pdx-1 gene. *Mol Endocrinol*. 2004;18(3):533–548.
31. Marshak S, Benshushan E, Shoshkes M, Havin L, Cerasi E, Melloul D. Functional conservation of regulatory elements in the pdx-1 gene: PDX-1 and hepatocyte nuclear factor 3beta transcription factors mediate beta-cell-specific expression. *Mol Cell Biol*. 2000;20(20):7583–7590.
32. Gerrish K, Cissell MA, Stein R. The role of hepatic nuclear factor 1 alpha and PDX-1 in transcriptional regulation of the pdx-1 gene. *J Biol Chem*. 2001; 276(51):47775–47784.
33. Ben-Shushan E, Marshak S, Shoshkes M, Cerasi E, Melloul D. A pancreatic beta-cell-specific enhancer in the human PDX-1 gene is regulated by hepatocyte nuclear factor 3beta (HNF-3beta), HNF-1alpha, and SPs transcription factors. *J Biol Chem*. 2001; 276(20):17533–17540.
34. Samaras SE, Cissell MA, Gerrish K, Wright CV, Gannon M, Stein R. Conserved sequences in a tissue-specific regulatory region of the pdx-1 gene mediate transcription in Pancreatic beta cells: role for hepatocyte nuclear factor 3 beta and Pax6. *Mol Cell Biol*. 2002;22(13):4702–4713.
35. Jacquemin P, Lemaigre FP, Rousseau GG. The One-cut transcription factor HNF-6 (OC-1) is required for timely specification of the pancreas and acts upstream of Pdx-1 in the specification cascade. *Dev Biol*. 2003;258(1):105–116.
36. Samaras SE, Zhao L, Means A, Henderson E, Matsuo TA, Stein R. The islet beta cell-enriched RIPE3b1/Maf transcription factor regulates pdx-1 expression. *J Biol Chem*. 2003;278(14):12263–12270.
37. Wiebe PO, et al. Ptf1a binds to and activates area III, a highly conserved region of the Pdx1 promoter that mediates early pancreas-wide Pdx1 expression. *Mol Cell Biol*. 2007;27(11):4093–4104.
38. Gannon M, Gamer LW, Wright CV. Regulatory regions driving developmental and tissue-specific expression of the essential pancreatic gene pdx1. *Dev Biol*. 2001;238(1):185–201.
39. Stoffers DA, Heller RS, Miller CP, Habener JF. Developmental expression of the homeodomain protein IDX-1 in mice transgenic for an IDX-1 promoter/lacZ transcriptional reporter. *Endocrinology*. 1999;140(11):5374–5381.
40. Krapp A, et al. The bHLH protein PTF1-p48 is essential for the formation of the exocrine and the correct spatial organization of the endocrine pancreas. *Genes Dev*. 1998;12(23):3752–3763.
41. Gao N, LeLay J, Vatamaniuk MZ, Rieck S, Friedman JR, Kaestner KH. Dynamic regulation of Pdx1 enhancers by Foxa1 and Foxa2 is essential for pancreas development. *Genes Dev*. 2008; 22(24):3435–3448.
42. Sellick GS, et al. Mutations in PTF1A cause pancreatic and cerebellar agenesis. *Nat Genet*. 2004; 36(12):1301–1305.
43. Stoffers DA, Ferrer J, Clarke WL, Habener JF. Early-onset type-II diabetes mellitus (MODY4) linked to IPF1. *Nat Genet*. 1997;17(2):138–139.
44. Xuan S, et al. Pancreas-specific deletion of mouse Gata4 and Gata6 causes pancreatic agenesis. *J Clin Invest*. 2012;122(10):3516–3528.
45. Zhao R, Watt AJ, Bartle MA, Li J, Bondow BJ, Duncan SA. Loss of both GATA4 and GATA6 blocks cardiac myocyte differentiation and results in cardia in mice. *Dev Biol*. 2008;317(2):614–619.
46. Beuling E, et al. GATA factors regulate proliferation, differentiation, and gene expression in small intestine of mature mice. *Gastroenterology*. 2011; 140(4):1219–1229.
47. Sodhi CP, Li J, Duncan SA. Generation of mice harbouring a conditional loss-of-function allele of Gata6. *BMC Dev Biol*. 2006;6:19.
48. McFadden DG, Charite J, Richardson JA, Srivastava D, Firulli AB, Olson EN. A GATA-dependent right ventricular enhancer controls dHAND transcription in the developing heart. *Development*. 2000; 127(24):5331–5341.
49. Hogan B, Bedington R, Costantini F, Lacy E. *Manipulating The Mouse Embryo*. Plainview, New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1994.
50. Dodou E, Xu SM, Black BL. mef2c is activated directly by myogenic basic helix-loop-helix proteins during skeletal muscle development in vivo. *Mech Dev*. 2003;120(9):1021–1032.
51. Anderson JP, et al. HRC is a direct transcriptional target of MEF2 during cardiac, skeletal, and arterial smooth muscle development in vivo. *Mol Cell Biol*. 2004;24(9):3757–3768.
52. Rojas A, Schachterle W, Xu SM, Martín F, Black BL. Direct transcriptional regulation of Gata4 during early endoderm specification is controlled by FoxA2 binding to an intronic enhancer. *Dev Biol*. 2010; 346(2):346–355.
53. Hald J, Sprinkel AE, Ray M, Serup P, Wright C, Madsen OD. Generation and characterization of Ptf1a antiserum and localization of Ptf1a in relation to Nkx6.1 and Pdx1 during the earliest stages of mouse pancreas development. *J Histochem Cytochem*. 2008;56(6):587–595.
54. Rojas A, Kong SW, Agarwal P, Gilliss B, Pu WT, Black BL. GATA4 is a direct transcriptional activator of cyclin D2 and Cdk4 and is required for cardiomyocyte proliferation in anterior heart field-derived myocardium. *Mol Cell Biol*. 2008; 28(17):5420–5431.
55. Rojas A, De Val S, Heidt AB, Xu SM, Bristow J, Black BL. Gata4 expression in lateral mesoderm is downstream of BMP4 and is activated directly by Forkhead and GATA transcription factors through a distal enhancer element. *Development*. 2005;132(15):3405–3417.
56. Yoshida T, Hanahan D. Murine pancreatic ductal adenocarcinoma produced by in vitro transduction of polyoma middle T oncogene into the islets of Langerhans. *Am J Pathol*. 1994;145(3):671–684.
57. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(9):e45.

# GATA4 Loss in the Septum Transversum Mesenchyme Promotes Liver Fibrosis in Mice

Irene Delgado,<sup>1,2</sup> Manuel Carrasco,<sup>1,2</sup> Elena Cano,<sup>3</sup> Rita Carmona,<sup>3</sup> Rocío García-Carbonero,<sup>4</sup>  
Luis M. Marín-Gómez,<sup>5</sup> Bernat Soria,<sup>1,2</sup> Francisco Martín,<sup>1,2</sup> David A. Cano,<sup>6</sup>  
Ramón Muñoz-Chápuli,<sup>3</sup> and Anabel Rojas<sup>1,2</sup>

The zinc finger transcription factor GATA4 controls specification and differentiation of multiple cell types during embryonic development. In mouse embryonic liver, *Gata4* is expressed in the endodermal hepatic bud and in the adjacent mesenchyme of the septum transversum. Previous studies have shown that *Gata4* inactivation impairs liver formation. However, whether these defects are caused by loss of *Gata4* in the hepatic endoderm or in the septum transversum mesenchyme remains to be determined. In this study, we have investigated the role of mesenchymal GATA4 activity in liver formation. We have conditionally inactivated *Gata4* in the septum transversum mesenchyme and its derivatives by using Cre/loxP technology. We have generated a mouse transgenic Cre line, in which expression of Cre recombinase is controlled by a previously identified distal *Gata4* enhancer. Conditional inactivation of *Gata4* in hepatic mesenchymal cells led to embryonic lethality around mouse embryonic stage 13.5, likely as a consequence of fetal anemia. *Gata4* knockout fetal livers exhibited reduced size, advanced fibrosis, accumulation of extracellular matrix components and hepatic stellate cell (HSC) activation. Haploinsufficiency of *Gata4* accelerated CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis in adult mice. Moreover, *Gata4* expression was dramatically reduced in advanced hepatic fibrosis and cirrhosis in humans. **Conclusions:** Our data demonstrate that mesenchymal GATA4 activity regulates HSC activation and inhibits the liver fibrogenic process. (HEPATOLOGY 2014;59:2358-2370)

**L**iver fibrosis is a pathophysiological response to chronic injuries produced mainly by alcohol abuse, virus infection, or bile duct obstruction. A common characteristic to all types of liver fibrosis is the transformation of quiescent hepatic stellate cells

(HSCs) into an active and proliferative myofibroblastic phenotype. Activated HSCs are the main source of liver extracellular matrix (ECM) components, such as collagen and laminin, that form the fibrotic scars.<sup>1</sup> Liver fibrosis can be reversed if the insult that initiated

Abbreviations: ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase;  $\beta$ -Gal, beta-galactosidase; bp, base pair; E, embryonic day; ECs, endothelial cells; ECM, extracellular matrix; EMSA, electrophoretic mobility shift assay; FCM, flow cytometry; HNF, hepatocyte nuclear factor; HSCs, hepatic stellate cells; IHC, immunohistochemistry; KO, knockout; mRNA, messenger RNA; PECAM-1, platelet endothelial cell adhesion molecule 1; PHH3, phosphohistone H3; qRT-PCR, quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction; SMA, smooth muscle alpha actin; STM, septum transversum mesenchyme; Tg, transgenic; WTI, Wilms' tumor 1; YFP, yellow fluorescent protein.

From the <sup>1</sup>Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER), Sevilla, Spain; <sup>2</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), Barcelona, Spain; <sup>3</sup>Department of Animal Biology, Faculty of Science, University of Malaga, Málaga, Spain; <sup>4</sup>Oncology Unit, Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS), Hospital Universitario Virgen del Rocío/Consejo Superior de Investigaciones Científicas/Universidad de Sevilla, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla, Spain; <sup>5</sup>Surgical Department, IBiS, Hospital Universitario Virgen del Rocío/Consejo Superior de Investigaciones Científicas/Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain; and <sup>6</sup>Endocrinology Unit, IBiS, Hospital Universitario Virgen del Rocío/Consejo Superior de Investigaciones Científicas/Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain.

Received July 11, 2013; accepted January 8, 2014.

I.D. was supported by a contract from Consejería de Salud, Junta de Andalucía (PI-0008). M.C. is a recipient of a predoctoral fellowship from Spanish Ministry of Education (AP2009-2582). E.C. is a recipient of a MINECO fellowship (BES-2009-014847). This work was supported by grants from ISCIII cofunded by Fondos FEDER, PI11/01125 to A.R., BFU2011-25304 (Ministerio de Economía y Competitividad), P11-CTS-7564 (Junta de Andalucía), and RD12/0019/0022 (TerCel network, ISCIII) to R.M.Ch., the Spanish Ministry of Science and Innovation (SAF2008-02469 and SAF2011-26805) and the Andalusian Regional Ministry of Economy, Science and Innovation (P08-CVI-3727) to D.A.C., and Instituto de Salud Carlos III (cofunded by FEDER: Red TerCel grants RD06/0010/0025 and PI10/00964), Consejería de Innovación Ciencia y Empresa, Junta de Andalucía (grant CTS-6505), the Ministry of Health and Consumer Affairs (Advanced Therapies Program Grant TRA-120), and the European Union: BIOREG SOE3/P1/E750 (cofunded by FEDER) to B.S.



it is removed. Regression of liver fibrosis implies breakdown of ECM by metalloproteinases and clearance of activated HSCs by apoptosis or reversion to an inactive phenotype.<sup>2</sup> However, if the injury is sustained, liver fibrosis can progress and lead to cirrhosis, which is marked by an excessive accumulation of ECM, distorted liver architecture, and impairment of hepatic function. Currently, one of the emerging therapies for liver fibrosis focuses on inhibition of HSC activation and proliferation.<sup>3,4</sup> Although much is known about the signals that trigger HSC activation in liver fibrosis, the transcription factors that mediate this process are relatively unknown.

GATA4 is a member of the zinc finger GATA transcription factor family that is expressed in various mesoderm- and endoderm-derived tissues.<sup>5</sup> Inactivation of *Gata4* in the germ line leads to embryonic lethality as a result of defects in extraembryonic endoderm.<sup>6-8</sup> During mouse development, *Gata4* is expressed in the foregut endoderm that eventually will form the hepatic bud, as well as in the adjacent lateral mesoderm at embryonic day (E) 8.0. By E9.0, endodermal cells delaminate from the hepatic bud and migrate into the septum transversum mesenchyme (STM), differentiating into hepatic lineages. During this developmental stage, *Gata4* expression is no longer detected in the delaminating hepatoblast, but it is strongly maintained in the STM.<sup>9</sup> At later stages of embryonic development and in adult liver, *Gata4* expression is restricted to the mesenchyme surrounding the liver and nonparenchymal cells.<sup>10,11</sup> Previous studies have shown that *Gata4* inactivation impairs liver formation. However, these studies were performed in *Gata4* tetraploid embryos to circumvent the embryonic lethality of the conventional *Gata4* knockout (KO) mice. Thus, whether these defects are caused by loss of *Gata4* in the hepatic endoderm or in the STM remains to be determined. In this study, we have investigated the role of mesenchymal GATA4 activity in liver formation by conditionally inactivating *Gata4* in the STM and its derivatives.

## Materials and Methods

**Mice.** *Gata4*<sup>flox/flox</sup>, *ROSA26RlacZ*, and *ROSA26R-YFP* mice and strategies for genotyping has been

previously described.<sup>12-15</sup> A 642-base-pair (bp) fragment containing the minimal promoter from the mouse *Mef2c* gene<sup>16</sup> was cloned into a plasmid containing the *Cre* complementary DNA and the SV40 splice and polyA signal sequence. An 817-bp fragment containing the conserved region, CR2, of the previously identified mouse G2 *Gata4* enhancer<sup>10</sup> was then cloned into the *Cre* expression vector to generate *Gata4* G2-*Cre* transgene. Transgenic (Tg) mice were generated as previously described.<sup>10</sup> *Gata4*<sup>flox/flox</sup> littermates were used as control mice in all experiments. All mouse experiments complied with institutional guidelines and were reviewed and approved by the institutional animal care and use committee of the University of Sevilla (Sevilla, Spain).

**Human Samples.** Human liver samples were obtained from liver biopsies and explanted fibrotic or cirrhotic livers from transplantation. An informed consent in writing was obtained from each patient of the study. The study protocol was approved by the ethics committee of the Hospital Universitario Virgen del Rocío, Seville, and the study was conducted according to the principles of the Declaration of Helsinki. Samples were classified by a pathologist according to METAVIR score<sup>17</sup> as follows: F0, no fibrosis; F1, portal fibrosis without septa; F3, numerous septa without cirrhosis; and F4, cirrhosis. Immunohistochemistry (IHC) for GATA4 was performed on 4- $\mu$ m paraffin sections of human liver from 7 patients with no fibrosis or mild fibrosis (F0-F1; patients 1-5: no apparent abnormalities; patients 6-7: periportal fibrosis grade I) and 8 with moderate or severe fibrosis (patients 8-10: hepatitis C viral infection; patients 11-14: alcoholic liver disease; and patient 15: primary biliary cirrhosis). Quantitative *GATA4* expression was determined by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) in liver samples of 6 patients with no fibrosis or mild fibrosis (F0-F1; patients 1-6) and 5 with moderate or severe fibrosis (F3-F4; patients 8, 9, 11, 14, and 15).

**Statistical Analysis.** All data are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean. Statistical analyses were performed using the two-tailed Student *t* test. A *P* value  $<0.05$  was considered statistically significant.

Detailed descriptions of materials and methods can be found in the Supporting Information.

Address reprint requests to: Anabel Rojas, Ph.D., Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa, Avenida Americo Vespucio s/n Parque Científico Isla de la Cartuja, 41092 Sevilla, Spain. E-mail: anabel.rojas@cabimer.es; fax: +34 954 461 664.

Copyright © 2014 by the American Association for the Study of Liver Diseases.

View this article online at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com).

DOI 10.1002/hep.27005

Potential conflict of interest: Nothing to report.

## Results

**Generation of a Cre-Expressing Mouse Strain to Target STM and Its Derivatives.** *Gata4* expression in the STM is controlled by a distal conserved sequence element, named *Gata4* CR2.<sup>10</sup> To target STM and its derivatives, we generated a Tg mouse line in which expression of Cre recombinase is controlled by the *Gata4* CR2 enhancer (G2-Cre mice). To examine the activity of Cre recombinase *in vivo*, G2-Cre mice were crossed to *ROSA26RLacZ* and *ROSA26RYFP* mice.<sup>13,14</sup> A total of 4 founder mice carrying the *Gata4* G2-Cre transgene were generated. Similar patterns of Cre activity were observed in all the founder lines (data not shown). Analysis of G2-Cre; *ROSA26RLacZ* embryos revealed robust beta-galactosidase ( $\beta$ -Gal) activity in the lateral mesoderm beginning at E8.5 and in the STM at E9.5 (Fig. 1A), consistent with the previously reported expression of the *Gata4*-G2-lacZ transgene.<sup>10</sup> Yellow fluorescent protein (YFP) staining was also found in the mesenchyme surrounding the endodermal hepatic bud in G2-Cre; *ROSA26RYFP* embryos at E9.5 (Supporting Fig. 1). By E13.5,  $\beta$ -Gal activity was observed in the liver capsule and in nonparenchymal liver cells (Fig. 1A). At that stage, YFP expression was also detected in the epicardium, indicating that *Gata4*-expressing cells from the STM mark the proepicardial cells that will give rise to the epicardium during cardiac development (Supporting Fig. 1).

To identify the mesenchymal hepatic cells marked by activity of the *Gata4* G2-Cre transgene, colocalization analysis of YFP expression with different hepatic markers were performed in E11.5 G2-Cre; *ROSA26RYFP* embryos. Endogenous GATA4 protein was found in all YFP-expressing cells, indicating that *Gata4* expression is maintained during delamination of cells from the liver mesothelium (Fig. 1B). The majority of YFP<sup>+</sup> cells coexpressed Wilms' tumor 1 (WT1), a marker of liver mesothelial cells, at E11.5<sup>18</sup> (Fig. 1B). WT1-expressing cells have been shown to give rise to HSCs.<sup>18,19</sup> In agreement with this observation, the majority of HSCs, as determined by desmin expression, expressed YFP (64%; Fig. 1B,C). In addition to HSCs, a minor population of endothelial cells (ECs) was positive for YFP in the liver (6.3%), as assessed by platelet endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM-1) staining (Fig. 1B) and flow cytometry (FCM) analysis (Fig. 1C). A low percentage of YFP-expressing leukocytes (CD45<sup>+</sup>) and megakaryocytes (CD41<sup>+</sup>) was also observed, representing 3.5% and 2.3% of each hematopoietic cell population, respectively

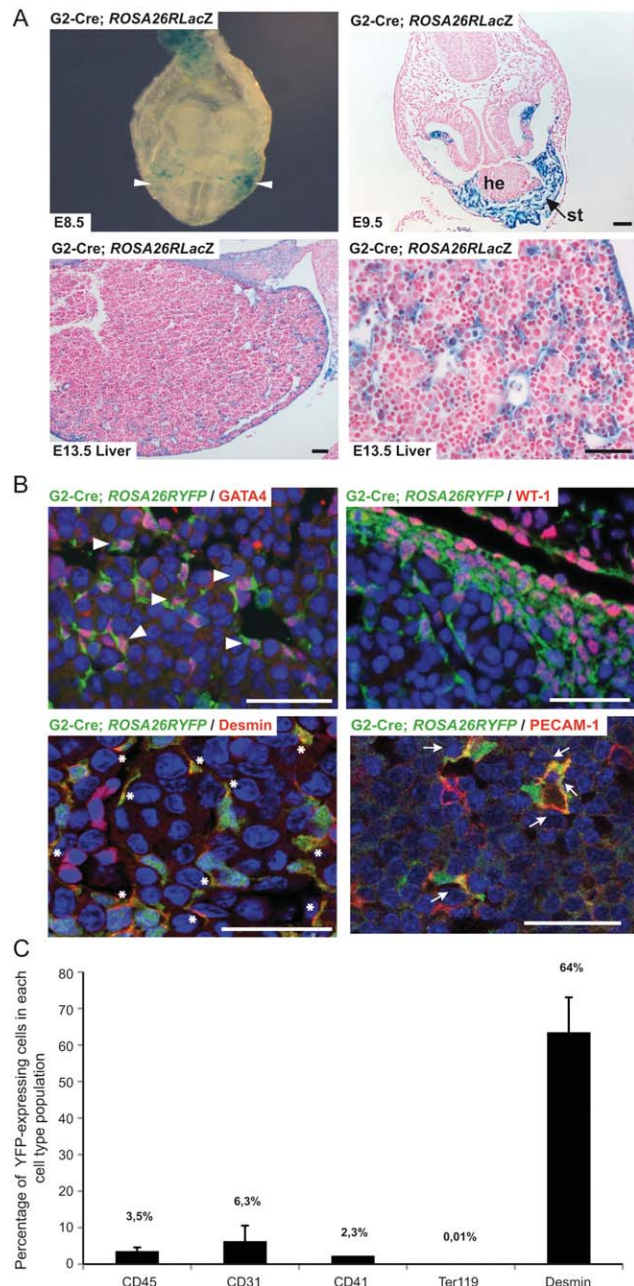


Fig. 1. The *Gata4* G2-Cre transgene marks the lateral mesoderm, STM, and its derivatives. (A) X-gal staining reveals Cre activity of the *Gata4* G2-Cre transgene in the lateral mesoderm (arrowheads) of G2-Cre; *ROSA26RLacZ* embryos at E8.5. Robust  $\beta$ -Gal activity is observed in the septum transversum (st, arrow), but not in the hepatic endoderm (he), at E9.5. At E13.5, *Gata4*-positive cells from the STM contribute to liver mesenchymal cells of the sinusoids. (B) Labeling of the *Gata4* G2-Cre lineage in *ROSA26RYFP* mice. Liver YFP<sup>+</sup> cells coexpress GATA4 at E11.5 (arrowheads). Most of the YFP<sup>+</sup> cells coexpress the mesothelial marker, WT1, in the mesothelium and the HSCs marker, desmin, in the sinusoids (asterisks). A few G2-Cre-marked cells are associated with blood vessels, as shown by expression of the endothelial marker, CD31 (PECAM-1; arrows). (C) Percentage of YFP<sup>+</sup> cells in each cell-type population, assessed by FCM analysis. Desmin-YFP-coexpressing cells were quantified by double immunostaining. Scale bars: 50  $\mu$ m.



(Fig. 1C). No contribution of *Gata4*-derived cells to the erythrocyte lineage ( $\text{Ter119}^+$ ) or hematopoietic stem cell ( $\text{Sca1}^+$ ) was observed (Fig. 1C and data not shown,

respectively). Of note, no  $\text{YFP}^+$  cells expressed the liver epithelial marker, hepatocyte nuclear factor (HNF)-1 $\beta$ , confirming the specificity of the Cre line to the mesodermal component of the liver (data not shown). Thus, our results show that *Gata4*-G2-Cre mouse strain efficiently targets the STM and its derivatives.

**Inactivation of *Gata4* in Hepatic Mesenchymal Cells Results in Embryonic Lethality and Liver Hypoplasia.** To analyze the role of mesenchymal GATA4 activity in liver formation, *Gata4* was specifically inactivated in the lateral mesoderm by crossing *Gata4*<sup>flox/flox</sup> mice to the G2-Cre line (hereafter, *Gata4* KO mice). Efficient excision of the *Gata4* floxed allele was confirmed by PCR of genomic DNA (Fig. 2A). Remarkably, these crosses did not yield *Gata4* KO offspring, indicating that GATA4 activity in the STM and/or its derivatives is crucial for embryonic development (Supporting Table 1). To determine onset of embryonic lethality, *Gata4* KO embryos were analyzed at different stages of development. At E11.5, *Gata4* KO embryos display a normal gross appearance and were present at normal Mendelian frequencies (Supporting Table 1 and data not shown). However, by E13.5, the number of *Gata4* KO embryos was under-represented (Supporting Table 1). At this stage, the *Gata4* KO embryos exhibited slight growth retardation and pale appearance, indicative of anemia (Fig. 2B).

It has been previously shown that *Gata4*<sup>-/-</sup> tetraploid embryos display hypoplastic ventricular myocardium, likely the result of a lack of proepicardium.<sup>9</sup> To determine whether embryonic lethality of *Gata4* KO mice might be caused by heart defects, we examined cardiac formation in conditional *Gata4* KO E13.5 embryos. Size and morphology of *Gata4* KO hearts were similar to those of control embryos (Supporting Fig. 1). These results suggest that *Gata4* loss in the epicardium does not have a detrimental effect in early cardiac development.

Next, we set out to determine whether *Gata4* inactivation in the STM might have a detrimental effect in liver formation. A dramatic reduction in liver mass

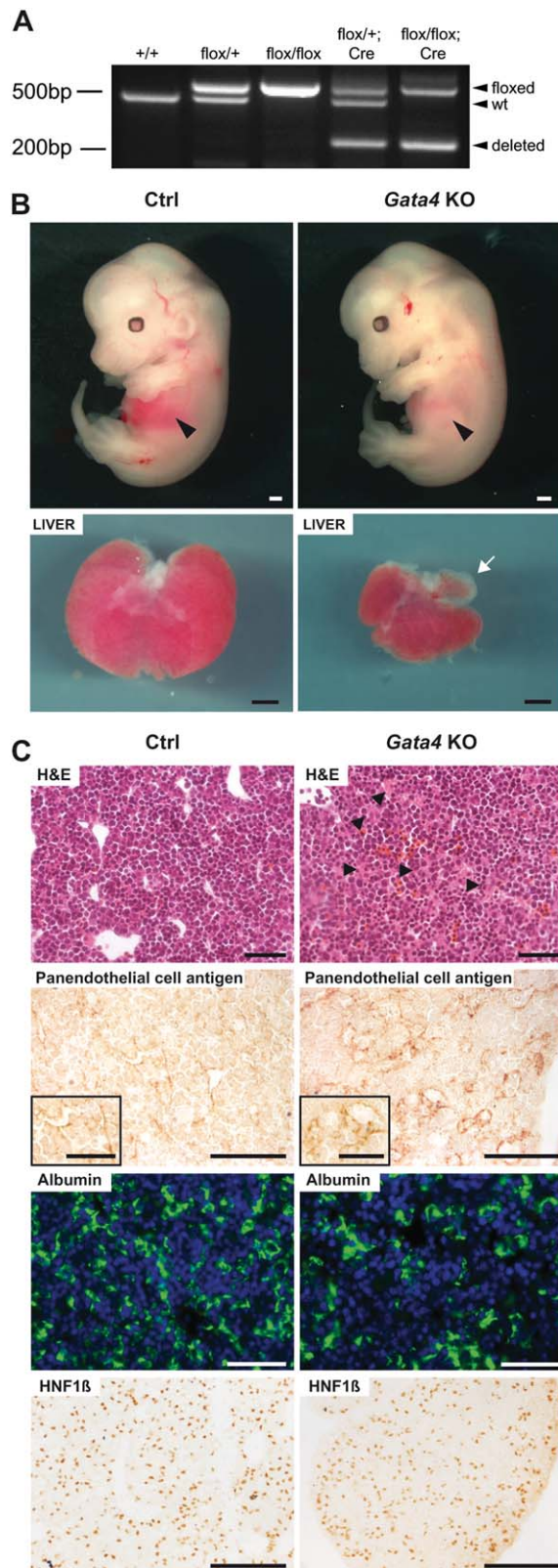


Fig. 2. Liver hypoplasia in *Gata4* conditional KO embryos. (A) PCR using specific primers for *Gata4* on genomic DNA from E13.5 livers demonstrates Cre-mediated excision of the *Gata4* floxed allele. (B) Pale appearance and reduced liver size (arrowhead) of E13.5 *Gata4* KO embryos, compared to control (Ctrl) embryos. Note the presence of fibrous-like tissue surrounding the lobules (arrow) in *Gata4* KO embryos. (C) Albumin and HNF-1 $\beta$  immunostaining reveals normal hepatocyte differentiation in E13.5 *Gata4* KO livers. Sinusoidal space appears to be increased in *Gata4* KO livers, as shown by immunostaining with vascular endothelial-specific antipanendothelial cell antigen. Scale bars in B and C: 500 and 50  $\mu\text{m}$ , respectively. Scale bars in insets: 25  $\mu\text{m}$ .

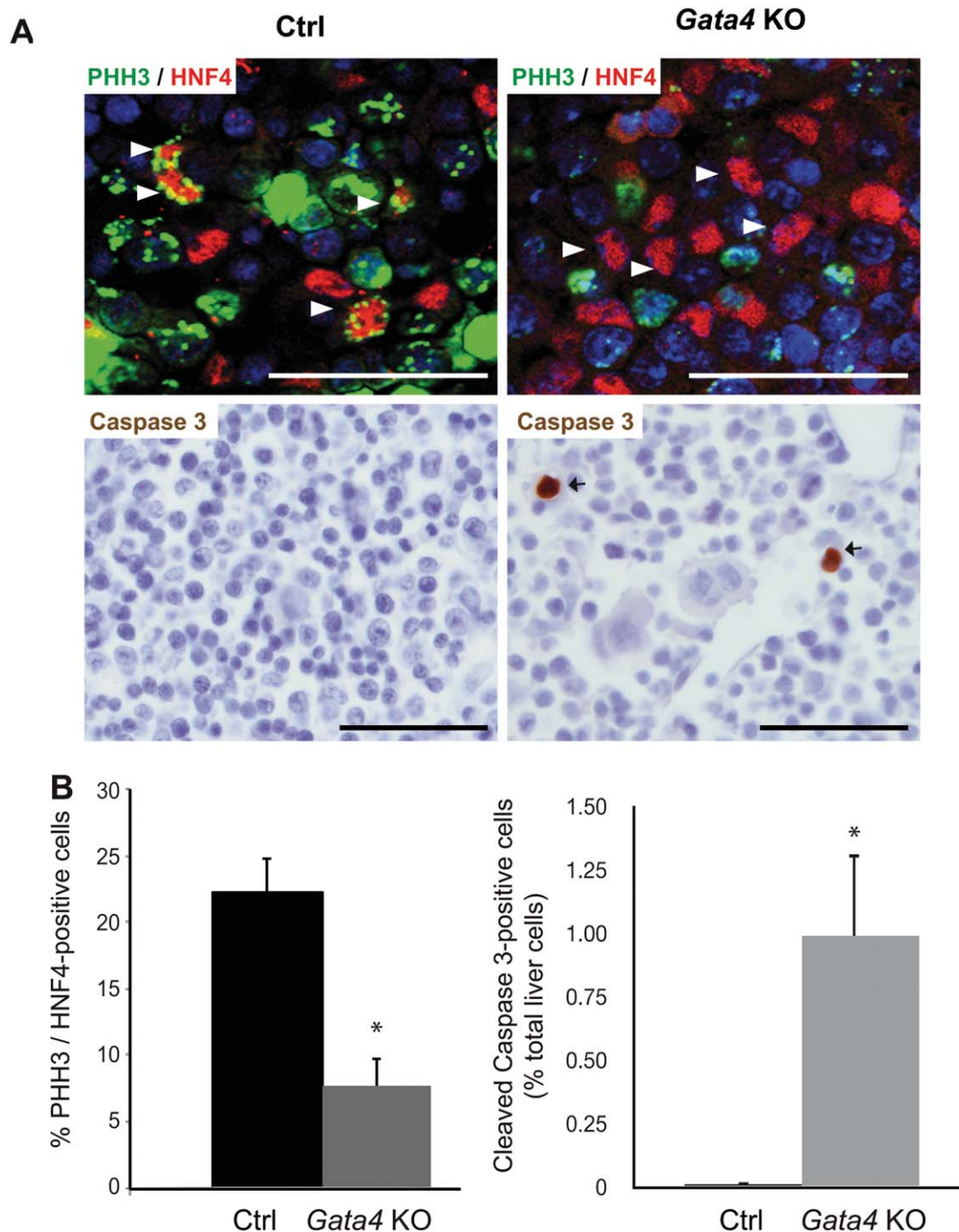


Fig. 3. Impaired proliferation and survival of hepatocytes in *Gata4* conditional KO embryos. (A) Proliferation is decreased in hepatocyte cells (marked by HNF-4 expression, arrowheads) in *Gata4* KO E13.5 fetal livers, as shown by PHH3 immunostaining. Increase in apoptotic hepatocytes in E13.5 *Gata4* KO livers, as assessed by activated caspase-3 immunostaining (arrows). (B) Quantification of proliferating and apoptotic hepatocytes. \* $P < 0.05$ . Scale bars: 50  $\mu$ m.

was observed in *Gata4* KO embryos (Fig. 2B). Histological analysis of *Gata4* KO livers did not reveal major defects in hepatic endoderm morphology (see below), although sinusoidal space appeared to be increased (Fig. 2C). Hepatocytes expressed mature liver markers, such as HNF-1 $\beta$  and albumin (Fig. 2C), indicating normal hepatocyte differentiation in the

absence of GATA4. To elucidate the mechanisms leading to decreased liver size, we measured proliferation of hepatocytes by double phosphohistone H3 (PHH3) and HNF-4 (a hepatocyte marker) immunostaining. A significant reduction of proliferating hepatocytes was observed in *Gata4* KO livers, compared to control livers, at E13.5 (Fig. 3A,B). Concomitant with this



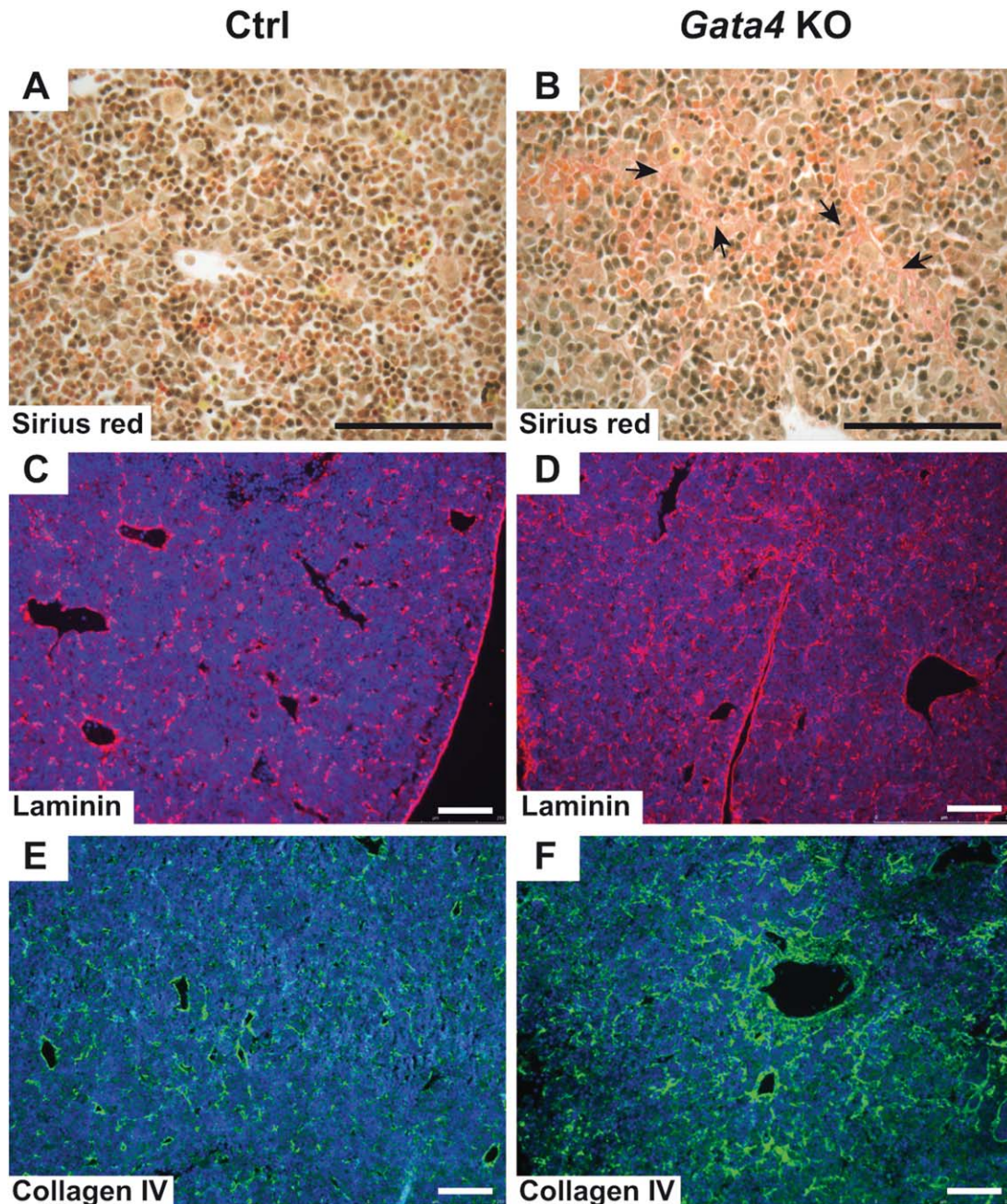


Fig. 4. Liver fibrosis in *Gata4* conditional KO fetal livers. (A and B). Increased fibrillar collagen deposition, as determined by Sirius Red staining, in E13.5 liver *Gata4* KO embryos, compared to control (Ctrl) embryos. Immunostaining for laminin (C and D) and collagen IV (E and F) on liver sections show elevated accumulation of ECM proteins in *Gata4* KO embryos, compared to control embryos at E13.5. Scale bars: 100  $\mu$ m.

decreased proliferation of hepatocytes, we observed a dramatic increase in apoptotic hepatocytes in *Gata4* KO livers (Fig. 3A,B). The pale aspect of *Gata4* KO embryos was suggestive of severe anemia that could be the cause of the observed embryonic lethality. Indeed, a dramatic decrease in hematopoietic cells, as assessed by FCM analysis, was observed in E12.5 *Gata4* KO livers (Supporting Fig. 2). Taken together, these results indicate that loss of GATA4 in the STM and/or its derivatives impairs fetal hematopoiesis and liver growth.

**Accumulation of ECM, Activation of HSCs, and Fibrosis Induction in *Gata4* KO Embryos.** The liver architecture of E13.5 *Gata4* KO embryos was distorted with fibrous-like tissue surrounding the lobules, suggesting an ongoing fibrotic process (Fig. 2B). Histological analysis revealed dispersed hepatocytes with sinusoidal spaces filled by collagen fibers in E13.5 *Gata4* KO livers (Fig. 4A,B). No apparent differences between *Gata4* KO and control embryos at earlier stages (E9.5 and E11.5) were observed, including



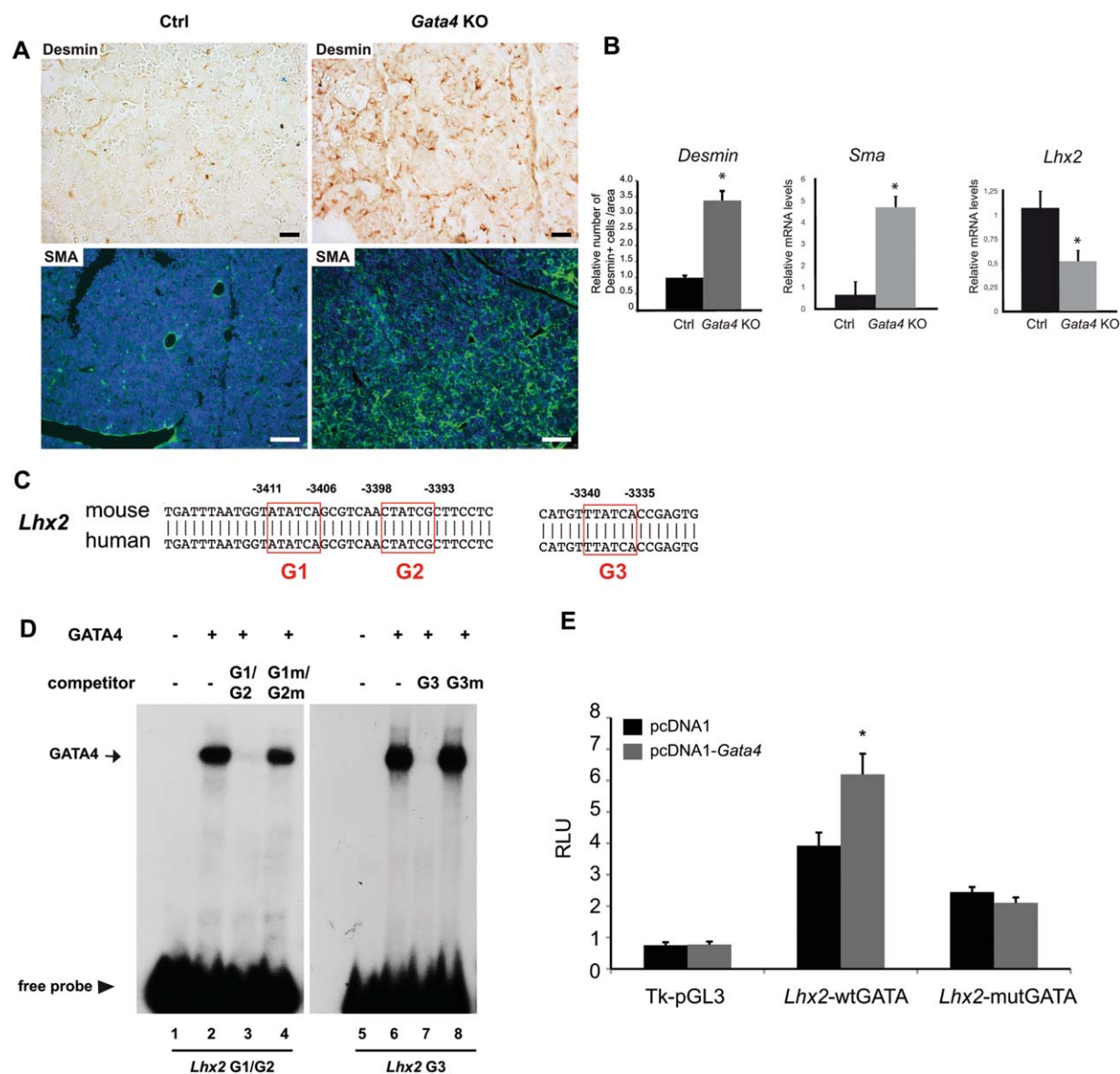


Fig. 5. HSC activation in the absence of GATA4 activity. (A) Increased expression of HSCs (marked by desmin expression) in E13.5 *Gata4* KO livers, compared to control livers. *Gata4* KO fetal livers display higher expression of SMA, a marker of HSC activation, compared to control livers. Scale bars: 100  $\mu$ m. (B) Quantification of desmin-expressing cells and qRT-PCR analysis of *Sma* and *Lhx2* expression in E13.5 control and *Gata4* KO livers. qPCR data indicate relative expression levels as ratios of normalized mean gene expression in *Gata4* KO embryos, compared to control embryos ( $n = 3$  embryos from each genotype). (C) Conserved GATA sites in the *Lhx2* promoter region. Alignment of mouse and human sequences of *Lhx2* promoter with the three GATA sites denoted as G1, G2, and G3 (red boxes). Numbers indicate the position of the GATA sites relative to the *Lhx2* transcriptional start site in mouse. (D) GATA4 recombinant protein binds to GATA sites in the *Lhx2* promoter. EMSA with radiolabeled double-stranded oligonucleotides encompassing the *Lhx2* G1 and G2 sites (lanes 1-4) and *Lhx2* G3 site (lanes 5-8). Lanes 1 and 5 do not contain recombinant GATA4 protein. Competition experiments were performed adding excess of unlabeled probe of itself (lanes 3 and 7) and mutated versions of itself (lanes 4 and 8). (E) Cotransfection of *Gata4* expression vector with *Lhx2*-wtGATA luciferase reporter gene containing the wild-type sequences of the three conserved GATA sites results in transactivation of the *Lhx2* promoter in 293T cells. Mutations of GATA sites in the *Lhx2* promoter (*Lhx2*-mutGATA) disrupt transactivation by GATA4.  $n = 9$ ;  $*P < 0.05$ . RLU, relative light units.

delamination and migration of liver mesothelial cells in the sinusoidal space and expression of activated HSC markers (Supporting Fig. 3). By E13.5, a marked increase of ECM components, laminin and collagen type IV, was observed in *Gata4* KO livers (Fig. 4C-F). Collagen and laminin are synthesized mainly by active

HSCs.<sup>20</sup> In agreement with that, a dramatic increase in the number of desmin-positive cells and expression of smooth muscle alpha actin (SMA) was observed in *Gata4* KO livers (Fig. 5A,B). Altogether, these results indicate that, in the absence of GATA4, HSCs acquire an active state inducing a fibrogenic process.

The liver abnormalities in *Gata4* KO embryos closely resemble those observed in mice deficient in the transcription factor LHX2.<sup>21</sup> Indeed, a significant decrease in *Lhx2* expression was observed in *Gata4* KO fetal livers, as assessed by quantitative reverse-transcription (qRT)-PCR (Fig. 5B). These results raised the question of whether GATA4 might directly regulate *Lhx2* expression. Bioinformatics analyses revealed three perfect consensus GATA-binding sites—known as G1, G2, and G3—at positions −3411, −3398, and −3340, respectively, relative to the mouse *Lhx2* transcriptional start site (Fig. 5C). These GATA sites are evolutionary conserved across species, including humans, rats, cows, dogs, rhesus monkeys, and chimpanzees, suggesting that they might represent regulatory elements. The three identified GATA sites in the *Lhx2* promoter were bound efficiently by recombinant GATA4 protein in electrophoresis mobility shift assay (EMSA) experiments (Fig. 5D). We next examined the requirement of the GATA sites in the *Lhx2* promoter (*Lhx2*-wtGATA) for activation in 293T cells. A significant level of activation of the *Lhx2*-wtGATA promoter, compared with the parent reporter vector, was observed (Fig. 5E). The *Lhx2*-wtGATA reporter construct was strongly transactivated by exogenously expressed GATA4 (Fig. 5E). Furthermore, this activation was dependent on the integrity of GATA-binding sites because mutation of the three GATA sites ablated transactivation of the *Lhx2*-mutGATA reporter construct (Fig. 5E). Taken together, our results indicate that GATA4 is a direct transcriptional activator of *Lhx2*.

***Gata4* Haploinsufficiency Exacerbates CCl<sub>4</sub>-Induced Fibrosis.** Our previous findings in *Gata4* KO embryos raise the question of whether GATA4 loss may cause liver fibrosis in adult stages. Because the embryonic lethality in *Gata4* KO mice precluded an analysis of liver function in adult mice, we examined conditional heterozygous *Gata4*<sup>flox/+</sup>; G2-Cre mice (hereafter, *Gata4* Het mice). Quantification of *Gata4* messenger RNA (mRNA) levels revealed a 50% decrease in *Gata4* Het mice, compared to control mice (Supporting Fig. 4). Gross morphological examination and histological analysis did not reveal obvious defects in adult *Gata4* Het livers (data not shown). To test whether *Gata4* haploinsufficiency might have an effect in HSC activation, *Gata4* Het mice were treated with repeated subcutaneous injections of CCl<sub>4</sub>, a widely used model for liver fibrosis.<sup>22,23</sup> We used a short-term CCl<sub>4</sub> treatment to induce moderate liver fibrosis. To exclude the possibility that *Gata4* Het mice might exhibit increase toxicity of CCl<sub>4</sub> upon acute injury with CCl<sub>4</sub>, we measured serum alanine aminotransferase

(ALT) and aspartate aminotransferase (AST) in control and *Gata4* Het mice 24 hours after the first CCl<sub>4</sub> injection. No significant differences in ALT and AST levels were observed between control and *Gata4* Het mice (Supporting Fig. 4). As expected, chronic CCl<sub>4</sub> treatment caused an increase in collagen fiber production in livers of control mice (Fig. 6A,B). CCl<sub>4</sub>-treated *Gata4* Het mice displayed a higher degree of liver fibrosis and increased septa, compared to CCl<sub>4</sub>-injected control mice (Fig. 6A,B). In agreement with these observations, liver hydroxyproline content was increased in CCl<sub>4</sub>-treated *Gata4* Het mice, compared to CCl<sub>4</sub>-treated control mice (Fig. 6B). Chronic injury with CCl<sub>4</sub> resulted in an increase in CD45<sup>+</sup> leukocytes in control mice. However, the degree of infiltrating CD45<sup>+</sup> cells was higher in CCl<sub>4</sub>-treated *Gata4* Het mice (Fig. 6A,B). *Gata4* Het mice displayed increased ALT and AST serum levels after CCl<sub>4</sub> treatment, compared to CCl<sub>4</sub>-treated control mice (Fig. 6C). These results indicate that haploinsufficiency of *Gata4* promotes CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis and support a role for GATA4 in maintaining the quiescent state of adult HSCs.

***Down-regulation of GATA4 Expression in Human Cirrhotic Liver.*** To provide further evidence for the role of GATA4 in hepatic fibrosis, we examined the expression of *GATA4* in liver samples from patients with advanced liver fibrosis and cirrhosis by IHC analyses. Similarly to what we observed in mice, GATA4 was found in HSCs of livers from healthy individuals or patients with mild fibrosis (F0-F1 fibrosis; Fig. 7A,B). Next, we analyzed GATA4 expression in livers of patients with advanced liver fibrosis of different etiologies. Staining with Sirius Red confirmed the excessive collagen deposition and bridging fibrosis characteristic of later stages of liver fibrosis (F3-F4; Fig. 7B). Remarkably, accumulation of GATA4 protein was dramatically decreased in F3-F4 patients, compared with F0-F1 patients (Fig. 7B). Quantitative analyses of *GATA4* mRNA levels confirmed the significant reduction in *GATA4* expression in patients with advanced fibrosis (Fig. 7C). These results indicate that *GATA4* expression becomes down-regulated in HSCs during progression of liver fibrosis.

***Overexpression of GATA4 in LX2 HSC Line Reduces the Fibrogenic Phenotype.*** Our previous results indicate that GATA4 inhibits HSCs activation. To test this hypothesis, we performed gain-of-function studies in the LX2 cell line, a human HSC cell line that recapitulates many features of the activated HSC phenotype. Of note, no GATA4 expression was detected in untransfected LX2 cells by immunostaining

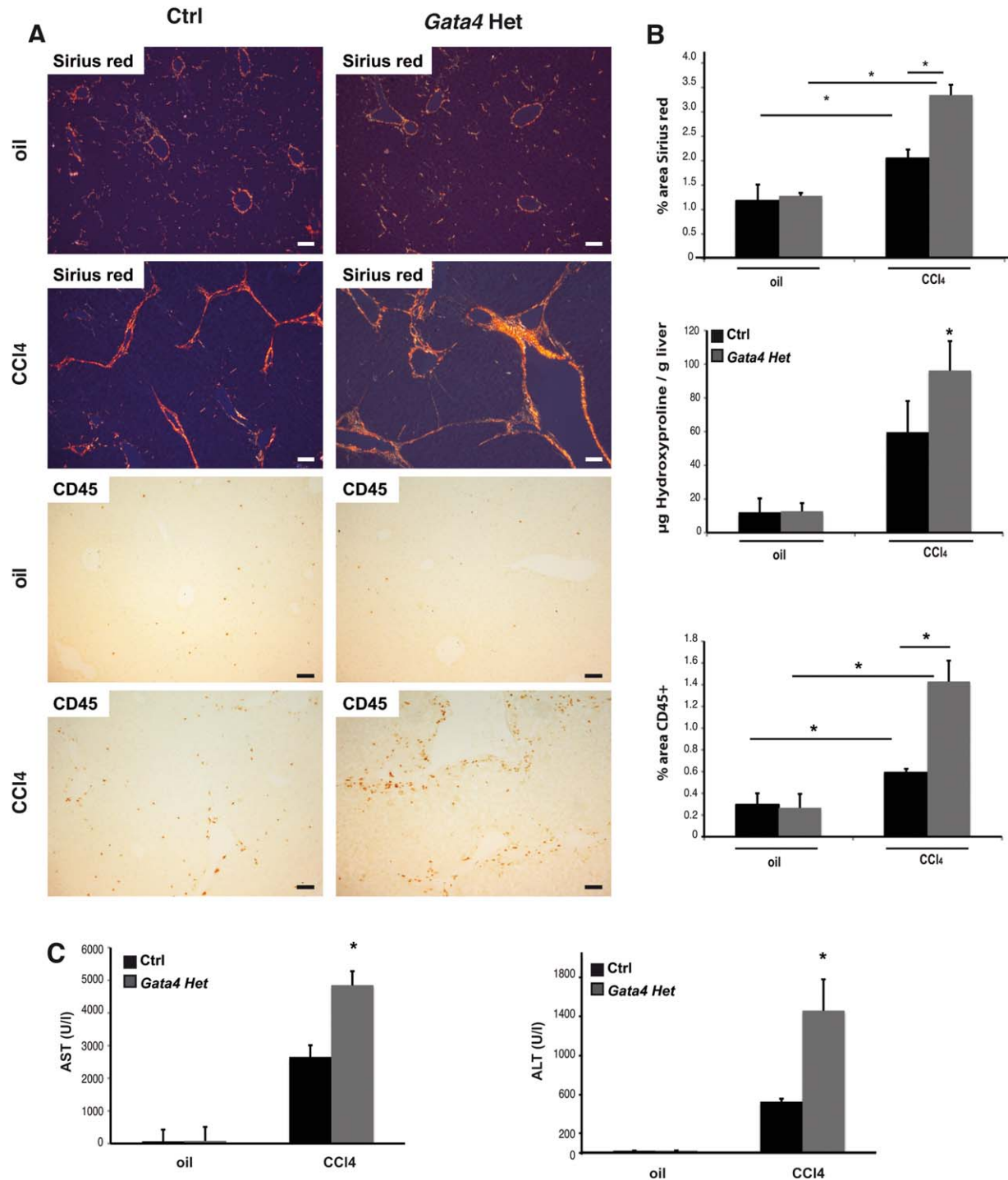


Fig. 6. *Gata4* conditional heterozygous mice exhibit increased CCl<sub>4</sub>-mediated liver fibrosis. (A) Polarized light microscopy pictures of Sirius Red-stained liver sections from control and *Gata4* conditional heterozygous adult mice (*Gata4* Het) treated with oil or CCl<sub>4</sub>. Increased inflammatory infiltrates (as assessed by CD45 immunostaining) after chronic exposure to CCl<sub>4</sub> in *Gata4* conditional heterozygous mice. (B) Quantification of collagen fiber area, hydroxyproline content, and percentage of area positive for CD45 in control and *Gata4* heterozygous adult livers. (C) Serum AST and ALT levels in adult mice after chronic exposure to CCl<sub>4</sub>. Ctrl oil: n = 3; *Gata4* Het oil: n = 3; Ctrl CCl<sub>4</sub>: n = 3; *Gata4* Het CCl<sub>4</sub>: n = 4. \**P* < 0.05. Scale bars: 50 μm.

(Fig. 8) and by qRT-PCR (data not shown). As expected, robust expression of fibrogenic markers, including SMA, laminin, and collagen, was found in control LX2 cells transfected with the empty vector. In

stark contrast, LX2 transfected with a *Gata4*-overexpressing vector dramatically decreased the accumulation of these fibrogenic markers (Fig. 8). qRT-PCR confirmed the decrease in collagen expression. A trend



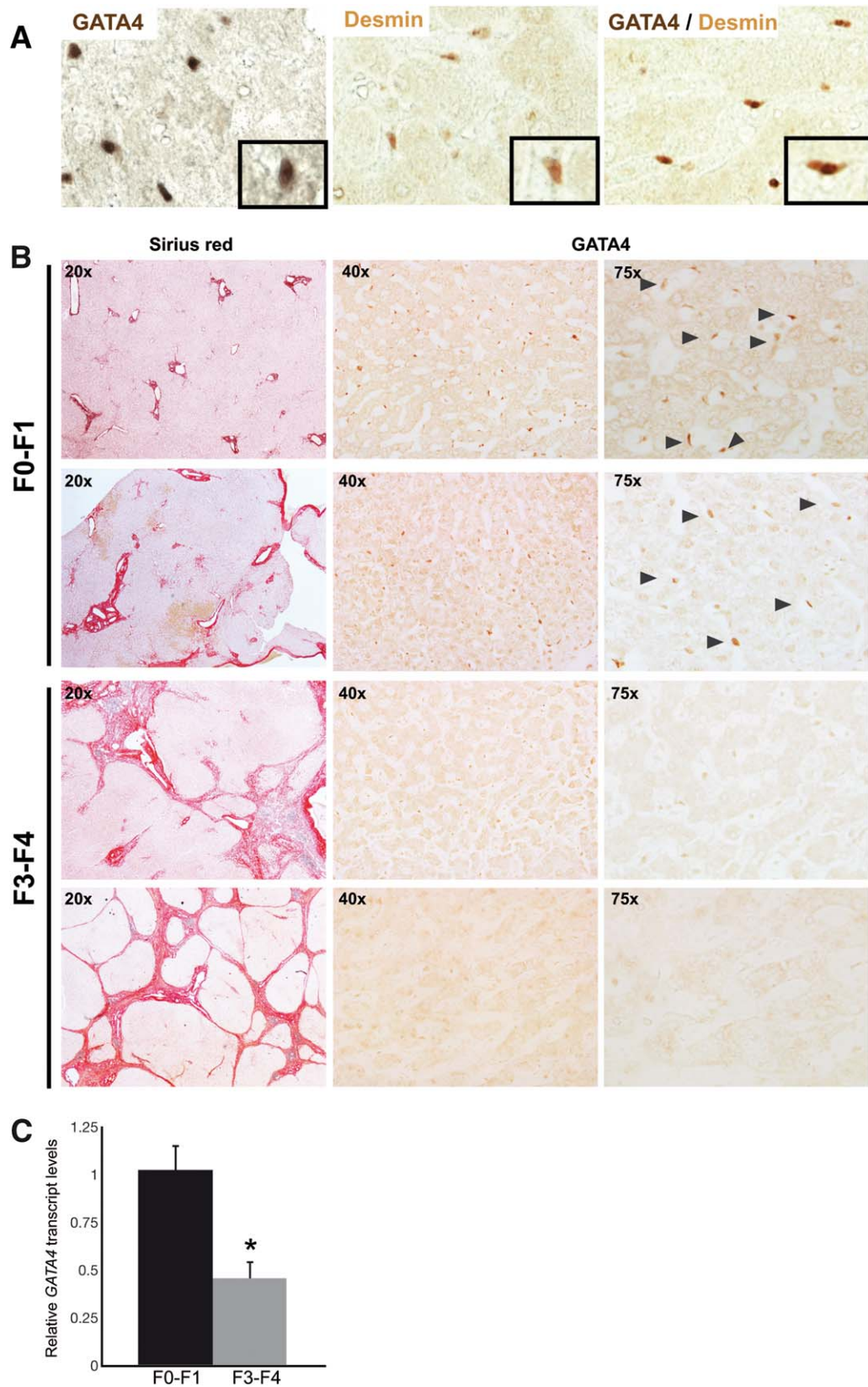


Fig. 7. Decreased *GATA4* expression in human advanced liver fibrosis. (A) Coexpression of *GATA4* and desmin in human HSCs. (B) Sirius Red staining and *GATA4*-expressing cells (arrowheads) detected by immunostaining in human liver sections from healthy/mild fibrotic livers (F0-F1) or livers with advanced liver fibrosis/cirrhosis (F3-F4). (C) qRT-PCR analysis of *GATA4* expression in human livers. Results indicate relative expression levels as ratios of normalized mean gene expression in livers with advanced fibrosis or cirrhosis (F3-F4), compared to F0-F1 livers. \* $P < 0.05$ .

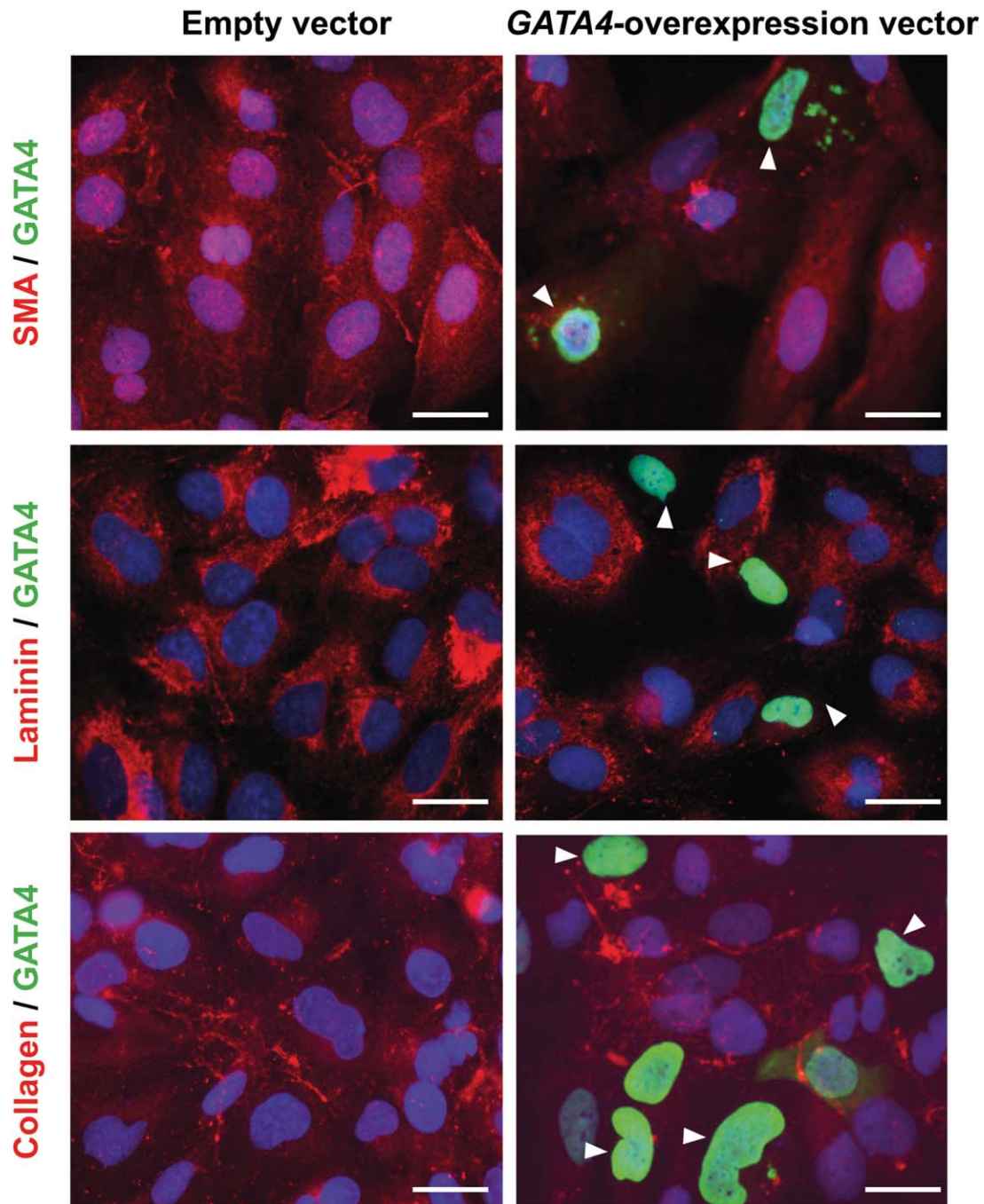


Fig. 8. *GATA4* overexpression impairs activation of HSCs. Decreased SMA, laminin, and collagen IV accumulation in *GATA4*-overexpressing LX2 HSCs (right panels, arrowheads), as assessed by immunocytochemical staining. Robust accumulation of these fibrogenic markers in LX2 cells transfected with empty vector (left panels). Scale bars: 25  $\mu$ m.

toward decreased SMA and laminin expression was also observed (Supporting Fig. 4). The lack of statistical significance of this decrease expression could be explained by the relatively low transfection efficiency obtained in LX2 cells (approximately 30%). Altogether, these results support a direct inhibitory role of *GATA4* on HSC activation.

## Discussion

In this study, we show that inactivation of *GATA4* in the hepatic mesenchyme results in severe liver hypoplasia and embryonic lethality. *Gata4* KO embryos exhibit progressive liver fibrosis associated with increased HSC activation. Haploinsufficiency of *Gata4*



accelerates CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis in adult mice. Furthermore, *Gata4* expression is reduced in advanced hepatic fibrosis and cirrhosis in humans. Altogether, these results demonstrate that GATA4 activity in the mesenchyme regulates HSC activation and inhibits the liver fibrogenic process.

Previous studies using genetic lineage tracing tools have shown that the STM gives rise to liver mesenchyme.<sup>18,24</sup> Thus, to specifically target the STM and its derivatives, we have generated a Tg mouse line in which Cre expression is directed by the *Gata4* CR2 enhancer.<sup>10</sup> Our analysis of G2-Cre mice reveals robust expression in the STM and the liver mesenchymal compartment during early and mid stages of embryonic development, respectively. Importantly, quiescent HSCs are efficiently targeted in G2-Cre mice. *Gata4* G2-Cre activity is also observed in a subset of ECs in the fetal liver. Although *Gata4* is not generally expressed in blood vascular endothelial cells, it has been reported to be expressed in liver sinusoidal endothelial cells.<sup>25</sup> Surprisingly, a minor population of leukocytes and megakaryocytes in fetal liver is also targeted by Cre-mediated recombination. The origin of these *Gata4*-derived hematopoietic cells is presently unclear. We did not detect erythrocytes marked by *Gata4* G2-Cre activity, arguing against the possibility of *Gata4* G2-Cre expression in a common myeloid precursor. Further investigations will be required to determine the origin of these *Gata4*-derived hematopoietic cells.

Liver bud growth is impaired in *Gata4* KO mice. However, liver bud induction and hepatocyte differentiation are not affected by loss of mesenchymal GATA4 activity. The reduced liver size of *Gata4* KO embryos appears to be a consequence of diminished hepatocyte proliferation and increased apoptosis. The liver mesenchyme produces a significant number of signaling molecules that promote hepatocyte proliferation and survival.<sup>26</sup> Thus, GATA4 might control some of these paracrine signals from the liver mesenchyme, affecting hepatic endoderm growth. *Gata4* KO mice exhibit impaired hematopoiesis, a somewhat surprising result considering that the G2-Cre transgene does not target the hematopoietic stem cell compartment. Therefore, impaired hematopoiesis in *Gata4* KO mice must be secondary to loss of GATA4 activity in HSCs and/or ECs, which have been shown to be important components of the hematopoietic microenvironment.<sup>27</sup>

The phenotype of *Gata4*-deficient fetal livers resembles the fibrogenic process that occurs in adult liver in response to external injury. Mutant fetal livers display increased expression and accumulation of ECM

proteins involved in adult liver fibrosis. In agreement with that, a dramatic increase of desmin- and SMA-expressing cells is observed in *Gata4* KO fetal livers, indicative of HSC activation. This increase in the number of activated HSCs in *Gata4* KO livers occurs very rapidly during embryonic development. *Gata4* KO livers appear highly fibrotic as early as E13.5, whereas no apparent abnormalities are observed in E11.5 *Gata4* KO livers. Of note, no increase in the number of migrating liver mesothelial cells was observed in E11.5 *Gata4* KO livers. These observations indicate that loss of GATA4 in developing HSCs leads to HSC activation, and thus suggest that GATA4 is a negative regulator of HSC activation and fibrogenesis. This hypothesis is strongly supported by the observed down-regulation of expression of genes associated with activated HSCs in the human HSC line, LX2, after *GATA4* overexpression.

*Gata4* KO livers display decreased expression of *Lhx2*, a gene involved in HSC activation.<sup>21</sup> *Gata4* KO mice phenocopy the effect of *Lhx2* inactivation, and *Gata4* and *Lhx2* expression patterns overlap during liver embryonic development,<sup>28</sup> suggesting a potential genetic interaction between these two transcription factors. Indeed, our EMSA experiments and transient transfection reporter assays indicate a direct binding of GATA4 to *Lhx2* promoter to activate the transcription. Thus, we propose a model in which GATA4 regulates *Lhx2* expression in the hepatic mesenchyme during fetal liver development, inhibiting HSCs activation and the associated fibrogenic process.

Consistent with the reported expression of *Gata4* in adult liver mesenchymal cells in mice,<sup>11</sup> our results show that mesenchymal *Gata4* activity also regulates adult liver fibrosis. Adult *Gata4* Het mice display exacerbated liver fibrosis upon CCl<sub>4</sub> treatment, indicating that the fibrogenic response to liver injury is sensitive to decreased *Gata4* gene dosage in liver mesenchymal tissue. Although a potential function of GATA4 in human liver fibrosis remains to be determined, our observations that *GATA4* expression is reduced in livers with advanced fibrosis or cirrhosis suggest that mesenchymal GATA4 activity might also regulate liver fibrosis in humans.

In conclusion, GATA4 function in liver mesenchymal cells is important for controlling HSC activation and may represent a new potential target for therapeutic strategies in liver fibrosis.

**Acknowledgment:** The authors thank Dr. William T. Pu for providing the *Gata4* floxed mice and Dr. Scott L. Friedman for providing LX2 cells. The

authors also thank Antonio Cárdenas and Raquel Araujo for their technical assistance. The authors are grateful to Biobanco of Hospital Virgen del Rocío. María del Pilar González Sánchez and Ana Morilla Camacho from CPYEA generated G2-Cre Tg mice.

## References

- Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005;115:209-218.
- Kisseleva T, Brenner DA. Role of hepatic stellate cells in fibrogenesis and the reversal of fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2007;22(Suppl 1):S73-S78.
- Bataller R, Brenner DA. Hepatic stellate cells as a target for the treatment of liver fibrosis. *Semin Liver Dis* 2001;21:437-451.
- Fallowfield JA. Therapeutic targets in liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011;300:G709-G715.
- Arceci RJ, King AA, Simon MC, Orkin SH, Wilson DB. Mouse GATA-4: a retinoic acid-inducible GATA-binding transcription factor expressed in endodermally derived tissues and heart. *Mol Cell Biol* 1993;13:2235-2246.
- Molkentin JD, Lin Q, Duncan SA, Olson EN. Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis. *Genes Dev* 1997;11:1061-1072.
- Kuo CT, Morrissey EE, Anandappa R, Sigrist K, Lu MM, Parmacek MS, et al. GATA4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and heart tube formation. *Genes Dev* 1997;11:1048-1060.
- Narita N, Bielinska M, Wilson DB. Wild-type endoderm abrogates the ventral developmental defects associated with GATA-4 deficiency in the mouse. *Dev Biol* 1997;189:270-274.
- Watt AJ, Zhao R, Li J, Duncan SA. Development of the mammalian liver and ventral pancreas is dependent on GATA4. *BMC Dev Biol* 2007;7:37.
- Rojas A, De Val S, Heidt AB, Xu SM, Bristow J, Black BL. Gata4 expression in lateral mesoderm is downstream of BMP4 and is activated directly by Forkhead and GATA transcription factors through a distal enhancer element. *Development* 2005;132:3405-3417.
- Zhao R, Watt AJ, Li J, Lueke-Wheeler J, Morrissey EE, Duncan SA. GATA6 is essential for embryonic development of the liver but dispensable for early heart formation. *Mol Cell Biol* 2005;25:2622-2631.
- Pu WT, Ishiwata T, Juraszek AL, Ma Q, Izumo S. GATA4 is a dosage-sensitive regulator of cardiac morphogenesis. *Dev Biol* 2004;275:235-244.
- Srinivas S, Watanabe T, Lin CS, Williams CM, Tanabe Y, Jessell TM, Costantini F. Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus. *BMC Dev Biol* 2001;1:4.
- Soriano P. Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat Genet* 1999;21:70-71.
- Rajagopal SK, Ma Q, Obler D, Shen J, Manichaikul A, Tomita-Mitchell A, et al. Spectrum of heart disease associated with murine and human GATA4 mutation. *J Mol Cell Cardiol* 2007;43:677-685.
- Dodou E, Verzi MP, Anderson JP, Xu SM, Black BL. *Mef2c* is a direct transcriptional target of ISL1 and GATA factors in the anterior heart field during mouse embryonic development. *Development* 2004;131:3931-3942.
- Poynard T, Ratziu V, Benmanov Y, Di Martino V, Bedossa P, Opolon P. Fibrosis in patients with chronic hepatitis C: detection and significance. *Semin Liver Dis* 2000;20:47-55.
- Asahina K, Zhou B, Pu WT, Tsukamoto H. Septum transversum-derived mesothelium gives rise to hepatic stellate cells and perivascular mesenchymal cells in developing mouse liver. *HEPATOLOGY* 2011;53:983-995.
- Ijpenberg A, Perez-Pomares JM, Guadix JA, Carmona R, Portillo-Sanchez V, Macias D, et al. Wt1 and retinoic acid signaling are essential for stellate cell development and liver morphogenesis. *Dev Biol* 2007;312:157-170.
- Friedman SL, Roll FJ, Boyles J, Bissell DM. Hepatic lipocytes: the principal collagen-producing cells of normal rat liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82:8681-8685.
- Wandzioch E, Kolterud A, Jacobsson M, Friedman SL, Carlsson L. *Lhx2*<sup>-/-</sup> mice develop liver fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:16549-16554.
- Constandinou C, Henderson N, Iredale JP. Modeling liver fibrosis in rodents. *Methods Mol Med* 2005;117:237-250.
- Weiler-Normann C, Herkel J, Lohse AW. Mouse models of liver fibrosis. *Z Gastroenterol* 2007;45:43-50.
- Asahina K, Tsai SY, Li P, Ishii M, Maxson RE, Jr., Sucov HM, Tsukamoto H. Mesenchymal origin of hepatic stellate cells, submesothelial cells, and perivascular mesenchymal cells during mouse liver development. *HEPATOLOGY* 2009;49:998-1011.
- Geraud C, Schledzewski K, Demory A, Klein D, Kaus M, Peyre F, et al. Liver sinusoidal endothelium: a microenvironment-dependent differentiation program in rat including the novel junctional protein liver endothelial differentiation-associated protein-1. *HEPATOLOGY* 2010;52:313-326.
- Zorn AM. Liver development (October 31, 2008), StemBook, ed. The Stem Cell Research Community, StemBook; 2008. doi: 10.3824/stembook.1.25.1. Available at: [www.stembook.org](http://www.stembook.org).
- Payushina OV. Hematopoietic microenvironment in the fetal liver: roles of different cell populations. *ISRN Cell Biol* 2012 Oct 2. doi: 10.5402/2012/979480.
- Kolterud A, Wandzioch E, Carlsson L. *Lhx2* is expressed in the septum transversum mesenchyme that becomes an integral part of the liver and the formation of these cells is independent of functional *Lhx2*. *Gene Expr Patterns* 2004;4:521-528.

## Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's website.

Manuel Carrasco, Anabel Rojas, Irene Delgado, Nadia Cobo  
Vuilleumier, Juan R. Tejedo, Francisco J. Bedoya, Benoit R. Gauthier,  
Bernat Soria, and Franz Martín

## Contents

Introduction .....	110
Overview of Pancreas Organogenesis and Pancreatic Islet Cell Differentiation .....	112
Transcription Factors Involved in Pancreas Specification and Multipotent Pancreatic Progenitors .....	114
Endocrine Commitment and Islet Differentiation .....	115
Maintenance of Islet Cell Identity and Function .....	117
miRNA Expression During Islet Cell Development and Epigenomic Phenomena .....	118
Concluding Remarks .....	121
Cross-References .....	122
References .....	122

## Abstract

Pancreatic islets are complex structures formed by five different hormone-expressing cells surrounded by endothelial cells, nerves, and fibroblasts. Dysfunction of insulin-producing cells ( $\beta$ -cells) causes diabetes. Generation of  $\beta$ -like cells that can compensate the loss of  $\beta$ -cell mass in type 1 diabetes or defects in  $\beta$ -cell insulin secretion in type 2 diabetes is a current challenge in biomedicine. The knowledge of the molecular basis governing pancreas development and islet formation will help us to generate in vitro or in vivo

M. Carrasco • A. Rojas • I. Delgado • J.R. Tejedo • F.J. Bedoya • B. Soria • F. Martín (✉)  
CIBERDEM, Barcelona, Spain

Andalusian Center of Molecular Biology and Regenerative Medicine (CABIMER), Seville, Spain  
e-mail: [manuel.carrasco@cabimer.es](mailto:manuel.carrasco@cabimer.es); [anabel.rojas@cabimer.es](mailto:anabel.rojas@cabimer.es); [irene.delgado@cabimer.es](mailto:irene.delgado@cabimer.es); [juan.tejedo@cabimer.es](mailto:juan.tejedo@cabimer.es); [fjberde@upo.es](mailto:fjberde@upo.es); [bernat.soria@cabimer.es](mailto:bernat.soria@cabimer.es); [fmarber@upo.es](mailto:fmarber@upo.es)

N.C. Vuilleumier • B.R. Gauthier

Andalusian Center of Molecular Biology and Regenerative Medicine (CABIMER), Seville, Spain  
e-mail: [nadia.cobo@cabimer.es](mailto:nadia.cobo@cabimer.es); [benoit.gauthier@cabimer.es](mailto:benoit.gauthier@cabimer.es)



$\beta$ -like cells to treat diabetes. Pancreas development is a highly complicated process, which is regulated by signaling pathways, transcription factors, nutrients, and other environmental factors. Collectively, these signals and factors act coordinated, in a spatial and temporal manner, throughout the embryonic pancreas. In this review we will summarize the main steps in pancreas development and will highlight the key transcription factors that have been shown to play essential roles in pancreas specification, maintenance of multipotent pancreatic progenitors, endocrine differentiation, and islet maturation. We will also discuss the role of microRNAs (miRNAs) in regulating islet cell fate.

---

**Keywords**

Endocrine progenitor cells • Transcription factors • Signaling pathways • Development • Differentiation • Gene regulatory networks

---

---

**Introduction**

Blood glucose homeostasis in adult mammals is maintained by the islets of Langerhans lodged within the exocrine tissue of the pancreas. Islets comprise approximately 2 % of the pancreas. Pancreatic islets contain several different cell types, including endocrine cells, endothelial cells, nerves, and fibroblasts. Rodent pancreatic islets house three main cell types, each of which produces a different endocrine product: (i)  $\beta$ -cells, which make up 60–70 % of the islets and release insulin; (ii)  $\alpha$ -cells (15–20 %), which secrete glucagon; and (iii)  $\delta$ -cells (5–10 %), which produce somatostatin. Minor cell types, which secrete a number of other peptides, make up about 5 % of the islets. These cells are pancreatic polypeptide-producing PP cells and ghrelin-producing cells, termed  $\epsilon$ -cells (Cabrera et al. 2006; Steiner et al. 2010). Interestingly, cell composition and spatial organization within an islet vary among species. The prototypic islet has  $\beta$ -cells forming a core surrounded by other endocrine cells in the periphery and corresponds to normal rodent islets. However, in human islets,  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\delta$ -cells appear to be randomly distributed throughout the islet and the composition differs to that of rodents: 50 % of  $\beta$ -cells, 40 % of  $\alpha$ -cells, 10 % of  $\delta$ -cells, and few PP cells (Cabrera et al. 2006). Variation in islet structure between species may result from different developmental mechanisms.

Diabetes mellitus (DM), characterized by hyperglycemia, stems from defects in insulin secretion, insulin action, or both. The vast majority of cases of DM fall into two broad etiopathogenetic categories: type 1 and type 2 DM (T1DM and T2DM). In the case of T1DM, the cause is an absolute deficiency of insulin secretion due to a cellular-mediated autoimmune destruction of  $\beta$ -cells. Autoimmune destruction of  $\beta$ -cells has multiple genetic predispositions and is also related to environmental factors that are still poorly defined. This form of diabetes accounts for only 5–10 % of cases. For T2DM, the cause is a combination of resistance to insulin action and an inadequate compensatory insulin secretory response. This form of DM is much

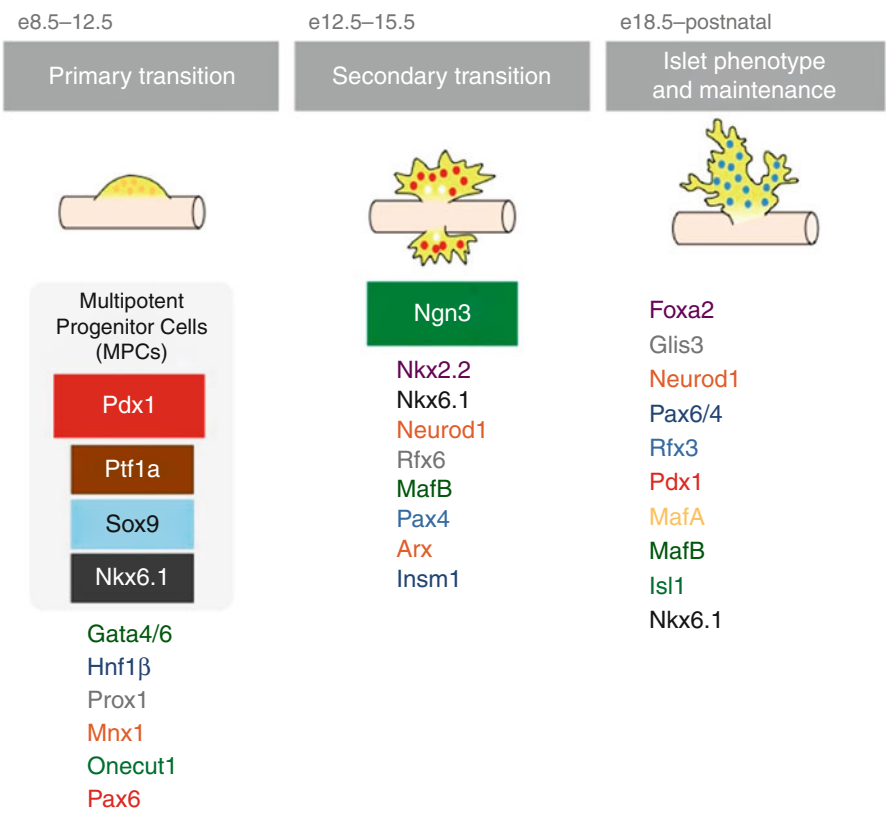
more prevalent and accounts for 90–95 % of patients with the disease. T2DM is considered a complex polygenic disorder in which common genetic variants interact with environmental factors (mainly lifestyle) to unmask the disease. Minor forms of DM include maturity-onset diabetes of the young (MODY) characterized by mutation in genes that will cause defects in insulin secretion and general  $\beta$ -cells dysfunction. This monogenetic form of DM is frequently characterized by an early onset of hyperglycemia generally before the age of 25 years.

To date, treatments for T2DM include insulin sensitizers and secretagogues as well as exogenous insulin therapy, while the latter is mandatory for T1DM. Pancreas/islet transplantation has been successfully used for the treatment of T1DM, but the shortage of pancreatic islets donors has motivated efforts to develop alternative renewable sources of  $\beta$ -cells (Soria et al. 2008). A promising approach has been the differentiation of embryonic/adult stem cells into  $\beta$ -cells.

Although success in generating insulin-producing cells from stem cells has been mitigated and even controversial, reports from the past decade do confirm a slow but promising progression toward producing such cells from a variety of stem cell sources such as embryonic stem cells, adult stem cells (pancreatic and non-pancreatic), induced pluripotent stem cells, and endocrine precursor or progenitor cells (Bonner-Weir et al. 2000; Soria et al. 2000; Ianus et al. 2003; Runhke et al. 2005; Kroon et al. 2008; Xu et al. 2008; Zhang et al. 2009; Thorel et al. 2010; Dave et al. 2013). Nevertheless, islets are intricate miniorgans that comprise several cell types in addition to  $\beta$ -cells and which most likely play an important role. In this context, it has been demonstrated that isolated pancreatic  $\beta$ -cells are less efficient than pancreatic islets releasing insulin indicating that a functional architecture is essential to integrate response to nutrients (Soria et al. 2010). Thus,  $\beta$ -cells and non- $\beta$ -cells are organized in islets in close intimacy to a dense vascularization and innervation that responds not only to glucose and other nutrients but also to hormones, neurotransmitters, and paracrine factors. In order to reproduce physiological blood glucose control, tissue engineering should consider the generation of pancreatic islets, more than  $\beta$ -cells alone.

In order to address this important issue, one needs to better understand how pancreatic islets development and formation proceed. Tremendous progress has been achieved in our understanding of transcription factors that govern the embryonic development of the pancreas and islet cell formation. Advances have also been made in characterizing the role of environmental factors in pancreatic islet development (Dumortier et al. 2007; Guillemain et al. 2007; Heinis et al. 2010). More recently, miRNA and epigenetics have emerged as important contributors of pancreas development and cell fate decisions during endocrine cell development.

The majority of proposed models on human pancreas development are derived from animal models, mainly mice. This is based on the assumption that the molecular and cellular aspects of pancreas development are conserved, although some aspects may differ. In addition, the development of pancreatic islets and the differentiation of its five cell types are very complex and tightly regulated process. Hence, there is still much to be learned regarding the transcription factors and epigenetic mechanisms underlying islet cell differentiation. In this chapter, we will discuss the



**Fig. 1** Schematic representation showing some of the key transcription factors important for the mouse pancreatic islet formation

current knowledge of transcription factors that play a key role in pancreatic islet development and differentiation. The chapter will focus mainly on pancreatic islet cells and pancreas embryogenesis and organogenesis will be briefly discussed.

### Overview of Pancreas Organogenesis and Pancreatic Islet Cell Differentiation

Pancreas development is a highly complex process, which is regulated by several signaling interconnected systems. The pancreas derives from definitive endoderm. Pancreatic developmental stages are classified as primary, secondary, and tertiary transitions (Pictet et al. 1972) (Fig. 1). Specification of definitive endoderm toward pancreatic fate (primary transition) occurs from embryonic day (e) 8.5–12.5 in mice. From the gut tube endoderm, two buds emerge (dorsal and ventral) and grow into the visceral mesoderm (Villaseñor et al. 2008). At e8.5, duodenal homeobox

factor-1 (Pdx1)-expressing multipotent progenitor cells appear in the ventral bud and subsequently in the dorsal pancreas, as well as in other locations (caudal stomach and proximal duodenum) (Jonsson et al. 1994). Already by e9.5 glucagon-expressing cells are detected. Insulin-positive cells, co-expressing glucagon, are seen at e10.5 (Herrera et al. 1991). In some studies, these cells are called the first wave or protodifferentiated  $\beta$ -cells. By e10.5 the gut tube rotates resulting in the fusion of both the dorsal and ventral buds (Slack 1995). Ghrelin-expressing cells can be detected at this time (Prado et al. 2004).

During the second transition period (e13.5 to E16.5), the pancreatic epithelium branches extend into the mesoderm forming ductal short fingerlike lobules (Villaseñor et al. 2010). This branching extends until birth forming the bulk of the pancreas. This period is critical for the formation of the exocrine and endocrine cells. Between e12.5 and E14.5, two domains of cells appear (trunk and tip). From the trunk will originate endocrine and ductal cells, while the tip domain will give rise to acinar cells (Zhou et al. 2007; Solar et al. 2009; Schaffer et al. 2010). From e13.5 onward a second wave of hormone-expressing cells including glucagon-, insulin-, somatostatin-, ghrelin-, and PP-positive cells will occur (Herrera et al. 1991; Prado et al. 2004). Thereafter, at e15.5 the endocrine precursors delaminate from the pancreatic epithelium and remaining cells within epithelium differentiate to form the exocrine compartment of the pancreas (Puri and Hebrok 2010). Migration of differentiated endocrine cells and final formation of the islets of Langerhans take place during the tertiary transition (e16.5 to birth). During this period, endocrine precursor cells migrate and coalesce into small islet-like clusters. Then, the clusters progressively receive more and more cells and proliferate into larger endocrine aggregates. It seems that islet cell proliferation extends throughout the life span, although at much lower rate, except in response to increased metabolic demands (Bonner-Weir et al. 2010).

In humans the first transition period occurs 2–3 weeks after blastocyst formation. A dorsal and a ventral outgrowth are already visible at days 25–26 of gestation (Piper et al. 2002) and a pancreas is observed at sixth week of gestational age (wGA) (Like and Orci 1972). The second transition period proceeds from 8 to 11 wGA (Polak et al. 2000). The critical window of differentiation of endocrine cells is from 9 to 23 wGA (Sarkar et al. 2008). Glucagon cells are found at 7 wGA (Assan and Biollot 1973), followed by insulin, somatostatin, and PP cells at 8–10 wGA (Stefan et al. 1983). Similarly to mice, a subpopulation of primitive endocrine cells that co-express insulin, glucagon, and somatostatin is detected at 8 wGA. This subpopulation has a low proliferation rate (Beringue et al. 2002). Endocrine differentiation in the human fetal pancreas also takes place in the islands of epithelial tissue but within a much larger volume of mesenchymal tissue (Sugiyama et al. 2007). In humans, small islet-like clusters appear at 11 wGA which become highly vascularized by 20–23 wGA (Jeon et al. 2009). The peak glucagon-positive cell proliferation occurs at 20 wGA and at 23 wGA for insulin and somatostatin cells (Sarkar et al. 2008). Intensive cell proliferation will continue after birth and during the perinatal period with the subsequent final generation of pancreatic islets. In contrast to rodents, human fetuses have functional islets able to develop nutrient-induced insulin release (Nicolini et al. 1990).

## Transcription Factors Involved in Pancreas Specification and Multipotent Pancreatic Progenitors

Most of our understanding about pancreas development has arisen from studies in animal models where several transcription factors have been genetically manipulated. Here we will review some of the key transcription factors that have been shown to play crucial roles in determining the pancreatic fate and generating pancreatic progenitors.

Within the primitive gut tube, the pancreatic domain is defined by the overlapping expression of Pdx1 and pancreas-specific transcription factor 1a (Ptf1a) (Chiang and Melton 2003; Kawaguchi et al. 2002). Pdx1 expression is first observed at e8.5 in the prepancreatic endoderm and its expression becomes restricted to pancreatic endocrine cells just before birth. Ptf1a is first expressed at e9.5 and its expression becomes restricted to acinar precursor cells. Pdx1 and Ptf1a play multiple roles at different stages of embryonic pancreas and in the adult pancreas. Inactivation of either Pdx1 or Ptf1a in mice leads to pancreas agenesis. Similarly, mutations in Pdx1 or Ptf1a genes cause severe pancreatic hypoplasia in humans (Kawaguchi et al. 2002; Ahlgren et al. 1996; Offield et al. 1996). Based on the early expression of these two transcription factors and the dramatic phenotype of Pdx1 and Ptf1a knockout mice, it has been proposed that the combination of both transcription factors determines the pancreatic fate within the foregut endoderm. However, recent studies of Pdx1 and Ptf1a double knockout mice have shown that in the absence of these two transcription factors, the pancreas is specified and a pancreatic rudiment is formed (Burlison et al. 2008), suggesting that other transcription factors also might contribute to determine the pancreatic fate.

Recent studies have shown that two members of the GATA zinc finger transcription factor family, GATA4 and GATA6, are crucial for pancreas development in mice (Carrasco et al. 2012; Xuan et al. 2012). GATA4 and GATA6 are expressed in the foregut endoderm prior to Pdx1 and Ptf1a expression. Given the early expression of GATA factors in the prepancreatic endoderm, it has been suggested that they might be potential candidates for pancreas specification. Indeed, GATA4 and GATA6 might even play redundant roles in pancreas formation in mice. Analysis of double GATA4/GATA6 knockout mice revealed pancreatic agenesis and a dramatic decrease in the expression levels of Pdx1 and Ptf1a. Furthermore, transgenic mice analysis and ChIP analysis have shown that GATA sites in the Pdx1 area III conserved region are required for Pdx1 transcriptional activity, indicating a direct regulation of Pdx1 by GATA factors (Carrasco et al. 2012; Xuan et al. 2012). However, initial pancreas formation also occurs in the absence of GATA4 and GATA6, indicating that these two transcription factors are also dispensable for pancreas specification (Xuan et al. 2012). Other transcription factors that are expressed in the prepancreatic endoderm, such as motor and pancreas homeobox 1 (Mnx1), hematopoietically expressed homeobox (Hhex), hepatocyte nuclear factor-1- $\beta$  (Hnf1b), and the SRY-box containing HMG transcription factor Sox17, might play a role in pancreas specification. However, it is plausible that organ specification is not achieved by a single transcription factor, but by a combination of transcription factors.

Following pancreas specification, a massive proliferation of undifferentiated cells, known as multipotent pancreatic progenitor cells (MPCs), forms the pancreatic bud. The MPCs within the pancreatic epithelium expand and branch to form a ductal tree. These morphological changes in the pancreatic epithelial occur between e9.5 and e12.5 in mice. Lineage tracing analyses have shown that MPCs retain the potential to give rise to all pancreatic lineages (acinar, ducts, and endocrine) until e12.5 (Solar et al. 2009; Kawaguchi et al. 2002; Zhou et al. 2007; Kopinke and Murtaugh 2010; Kopinke et al. 2011). The transcription factors that have been shown to be critical for the formation and maintenance of MPCs include Pdx1, Ptf1a, SRY (sex-determining region Y)-box 9 (Sox9), prospero homeobox 1 (Prox1), Mnx1, onecut homeobox 1 (Onecut1), Hnf1b, and GATA4/GATA6. Many of these transcription factors regulate each other and their own expression to form a specific cross-regulatory network. Thus Pdx1 is directly activated by forkhead box A2 (Foxa2), GATA4, GATA6, hepatocyte nuclear factor 6 (Hnf6), and Ptf1a. Sox9 regulates the expression of other MPC genes like Hnf1b, Hnf6, and FoxA2. Several MPC genes, like Nk homeobox protein 6.1 (Nkx6.1), Hnf6, and Mnx1, have been described as direct targets of Ptf1A. This cross-regulatory network during early formation ensures the proliferation, expansion, and identity of the MPCs that are required for the normal progression of pancreas development (Fig. 1).

---

## Endocrine Commitment and Islet Differentiation

Between e12.5 and e15.5 in mouse pancreas development, a period known as secondary transition is characterized by a massive wave of endocrine and exocrine cell differentiation (Pictet and Rutter 1972). During these pancreatic developmental stages, the pancreatic epithelium is well defined into two domains, tip and trunk, to generate acinar progenitor cells and endocrine/ductal progenitor cells, respectively (Zhou et al. 2007; Solar et al. 2009; Kopp et al. 2011). These two domains are also delimited by the expression of specific transcription factors. Thus, Ptf1a is specifically expressed in the tip cells, whereas Sox9, Hnf1b, and Nkx6.1 are expressed in the trunk domain (Kopp et al. 2011; Schaffer et al. 2010; Solar et al. 2009; Zhou et al. 2007; Hald et al. 2008). The mechanism that controls this lineage allocation is not clear yet, but studies have shown that Ptf1a and Nkx6 factors (Nkx6.1 and Nkx6.2) mutually antagonize each other to specify either the exocrine or ductal/endocrine fate, likely via repression of Ptf1a expression by Nkx6 proteins (Schaffer et al. 2010). In the secondary transition, scattered cells within the trunk transiently express the master regulator of endocrine commitment neurogenin 3 (Ngn3) (Fig. 1).

Ngn3 expression is first observed at e9.5. Its expression peaks during the secondary transition and decreases at later stages of pancreas development (Schwitzgebel et al. 2000). Inactivation of Ngn3 in mice causes loss of all endocrine cell types, but the exocrine pancreas is properly formed (Gradwohl et al. 2000). A complex cross-regulatory transcription factor network directly regulates Ngn3 activation. This transcription factor network includes Foxa2, GLI-similar zinc finger protein 3 (Glis3), Hnf1b, Pdx1, and Sox9 (Arda et al. 2013; Lynn et al. 2007a;

Oliver-Krasinski et al. 2009; Ejarque et al. 2013; Lee et al. 2001; Yang et al. 2011). Lineage tracing studies of Ngn3-positive cells have determined that they are allocated to a single endocrine cell lineage. Therefore, Ngn3-positive cells are unipotent endocrine precursors (Desgraz and Herrera 2009). Still it is not clear how Ngn3-expressing precursors are instructed to specific islet cell fate, but it has been suggested that the timing of Ngn3 activation in precursor cells can determine the endocrine cell type formed (Johansson et al. 2007). Thus, Ngn3 expression induced in early pancreas development promotes the formation of  $\alpha$ -glucagon-producing cells. The induction of Ngn3 expression from e11.5 onward promotes the generation of  $\beta$ - and PP cells. From e14.5 onward, Ngn3-expressing cells become competent to generate  $\delta$ -cells, whereas the competence to form  $\alpha$ -cells markedly diminishes (Fig. 1).

A number of transcription factors downstream of Ngn3 have been shown to play important roles in endocrine cell type differentiation, like neuronal differentiation 1 (Neurod1), paired box gene 4 (Pax4), insulinoma-associated 1 (Insm1), Nk homeobox protein 2.2 (Nkx2.2), and myelin transcription factor 1 (Myt1) (Smith et al. 2003; Mellitzer et al. 2006; Huang et al. 2000; Watada et al. 2003; Gasa et al. 2004; Wang et al. 2008; Smith et al. 2010; Arda et al. 2013), although in some cases the direct activation of their promoter by Ngn3 has not yet been established. Defects in islet formation have recently been described in mice lacking the transcription factor regulatory X-box binding 6 (Rfx6). Rfx6 is broadly expressed in the gut endoderm including the nascent pancreatic bud at e9.5. From e10.5, Rfx6 is only found in endocrine cells and its expression persists in adult islet cells (Smith et al. 2010; Soyer et al. 2010). Rfx6 mutant mice display a dramatic reduction in all endocrine precursor cell types except PP cells. Other transcription factors whose inactivation produces differential loss of endocrine cell types are Pax4, aristaless-related homeobox (Arx), and Nkx-homeodomain factors.

Three Nkx genes are expressed from early stages of pancreas development; however, their function in multipotent pancreatic progenitors is not clear yet as they seem to be dispensable for early pancreas formation. Nkx6.1 and Nkx6.2 play partial redundant roles in endocrine formation (Sussel et al. 1998; Sander et al. 2000; Henseleit et al. 2005). Nkx6.1/Nkx6.2 double mutants have reduced the number of  $\alpha$ - and  $\beta$ -cells. However, in Nkx6.1 only  $\beta$ -cell formation is affected. Nkx6.2 null mice have no obvious defects in pancreas formation and islet differentiation (Henseleit et al. 2005). Inactivation of Nkx2.2 causes total loss of  $\beta$ -cells and a reduced number of  $\alpha$ - and PP cells (Sussel et al. 1998). A recent study has shown a genetic interaction between Nkx2.2 and Neurod1 in the specification of endocrine cell lineages. Activation of Neurod1 by Nkx2.2 is required for  $\beta$ -cell formation, while Nkx2.2 repress Neurod1 in order to properly allocate  $\alpha$ -cells (Mastracci et al. 2013).

The opposing activities of Pax4, an important  $\beta$ -cell differentiation transcription factor, and Arx, a key factor in  $\alpha$ -cell specification, are another example of regulation of fate choice between  $\alpha$ - and  $\beta$ -cells (Sosa-Pineda et al. 1997; Collombat et al. 2003). During endocrine differentiation, Pax4 and Arx expression becomes restricted to  $\beta$ - and  $\alpha$ -cells, respectively. Pax4 inactivation causes loss of  $\beta$ - and  $\delta$ -cells (Collombat et al. 2003). Ectopic expression of Pax4 and Arx in



endocrine progenitor cells induces  $\beta$ - and  $\alpha$ -cell formation (Collombat et al. 2003, 2007, 2009). Thus, Pax4 promotes  $\beta$ - and  $\delta$ -cell fate, while Arx promotes  $\alpha$ -cell fate at the expense of  $\beta$ - and  $\delta$ -cell fate. The antagonist interaction between these two transcription factors might be mediated by reciprocal repression at the transcriptional level (Collombat et al. 2003, 2007). Arx also has an antagonist relationship with Nkx6.1 in determining endocrine fate choice. Misexpression of Nkx6.1 in endocrine progenitor cells promotes  $\beta$ -cell formation at the expense of the  $\alpha$ -cell lineage (Schaffer et al. 2013), while ectopic expression of Arx, as discussed above, results in the opposite alteration. It is important to note that maintenance of endocrine cell identity requires not only the activation of specific genes for a particular cell lineage but also the repression of other genes. This statement is well illustrated in the study in which inactivation of Nkx2.2 specifically in  $\beta$ -cells causes  $\beta$ - to  $\alpha$ -cell transdifferentiation due to derepression of Arx (Papizan et al. 2011).

Pdx1 might also play an important role in the commitment of  $\beta$ -cell fate choice. Enforced expression of Pdx1 in endocrine progenitors induces  $\beta$ -cell formation and decreases the number of  $\alpha$ -cells (Yang et al. 2011). In agreement with the notion of Pdx1 as regulator of  $\beta$ -cell fate, the inactivation of Pdx1 in embryonic  $\beta$ -cell produces an increase in  $\alpha$ -cells (Gannon et al. 2008).

In summary, the studies described above illustrate the plasticity of different endocrine cell types as a result of forced expression of lineage-specific transcription factors. These results might be relevant in reprogramming strategies to obtain new sources of  $\beta$ -cells for diabetes therapies.

---

## Maintenance of Islet Cell Identity and Function

From e16.5 onward, the endocrine cells coalesce into clusters of different cells to generate the pancreatic islets. A significant number of transcription factors have been shown to be required for the terminal cell differentiation and maintenance of islet function, including Foxa2, Glis3, Neurod1, paired box gene 6 (Pax6), transcription factor regulatory X-box binding 3 (Rfx3), Pdx1, v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A (MafA), v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B (MafB), and ISL LIM homeobox 1 (Isl1) as shown by inactivation analyses of these genes in differentiated islets. Thus, ablation of Isl1 prior to secondary transition results in the reduction of mature endocrine cell number (Du et al. 2009). Inactivation of Pdx1 in adult islet cells causes loss of  $\beta$ -cell mass, downregulation of amylin/IAPP, loss of insulin expression, and downregulation of Glut2 (Ahlgren et al. 1998; Lottmann et al. 2001; Thomas et al. 2001; Holland et al. 2005). Ablation of Neurod1 after differentiation resulted in glucose intolerance, decreased insulin release, and reduced insulin 1 (Ins1) expression (Gu et al. 2010) (Fig. 1).

MafA and MafB transcription factors determine the degree of  $\beta$ -cell maturation, as MafB is required during  $\beta$ -cell development and MafA is crucial for mature  $\beta$ -cell function (Nishimura et al. 2006). MafB is expressed at e12.5 in both insulin- and glucagon-positive cells and its expression becomes restricted to  $\alpha$ -cells at postnatal stages (Artner et al. 2006). MafB ablation produces a decrease in the

number of insulin- and glucagon-positive cells and the appearance of insulin-positive cells is delayed (Artner et al. 2007). Loss of MafB is associated with downregulation of transcription factors necessary for  $\beta$ -cell maturation and function such as Pdx1, MafA, Nkx6.1, and Glut2 at late stages of development. However, the expression levels of these genes are still normal until e15.5 (Artner et al. 2007; Nishimura et al. 2008). Several studies have shown that MafB is essential for insulin and glucagon transcriptional activation and it is an important regulator of  $\beta$ -cell maturation genes, such as Slc2a2 (glucose sensing), Slc30a8 (vesicle maturation), Camk2b (Ca<sup>2+</sup> signaling), and Nnat (insulin secretion) (Artner et al. 2010).

MafA is a  $\beta$ -cell-specific transcription factor that interacts with Pdx1 and Neurod1 to activate  $\beta$ -cell genes, including insulin (Aramata et al. 2007; Wang et al. 2007). MafA is expressed during pancreas development and its expression restricts to insulin-positive cells from e13.5 onward (Matsuoka et al. 2004). MafA seems to be dispensable for pancreas organogenesis, as MafA<sup>-/-</sup> mice and pancreas-specific MafA mutant mice do not have any obvious defect in pancreas formation. However, MafA null mice display aberrant adult islet architecture and defects in  $\beta$ -cell function (Zhang et al. 2005; Artner et al. 2010), indicating that MafA activity might be important exclusively in adult  $\beta$ -cells. It has been hypothesized that MafA expression levels could be a sensitive indicator of the functionality of  $\beta$ -cells, as changes in glucose levels regulate MafA activity (Raum et al. 2006).

---

## miRNA Expression During Islet Cell Development and Epigenomic Phenomena

In recent years miRNAs have emerged as novel regulators of  $\beta$ -cell development and function. miRNAs are single-stranded RNA molecules ranging in size from 18 to 22 nucleotides. The mammalian genome encodes for several hundred miRNAs that fine-tune gene expression through modulation of target mRNAs (Ambros 2004). miRNAs play a fundamental role in regulating gene expression in key biological events such as cell proliferation, differentiation, death, and malignant transformation (Bartel 2004). In addition, miRNAs seem to have a major role during embryonic development (Tang et al. 2007). The role of miRNAs during embryogenesis is particularly apparent in knockout mice lacking one of several key miRNA-processing genes such as Dicer, DiGeorge syndrome critical region gene 8 (Dgcr8), Drosha, or argonaute RISC catalytic component 2 (Ago2). Indeed, these knockout mice die during early gestation with severe developmental defects (Bernstein et al. 2003; Morita et al. 2007).

miRNAs appear to be critical for pancreas development. To date, 125 miRNAs have been shown to be involved in pancreatic development by regulating ductal, exocrine, and endocrine pancreatic pathways (Lynn et al. 2007b; Table 1). Specific deletion of Dicer in pancreatic progenitors produces defects in all pancreatic lineages and has a major impact in endocrine  $\beta$ -cells. The endocrine defect was associated with an increase in the notch-signaling target hairy and enhancer of split 1 (Hes1) and a reduction in the formation of endocrine cell progenitors expressing

**Table 1** miRNAs involved in pancreas development. Partial list of miRNAs proved to be necessary for pancreas development, together with their corresponding targeted transcription factors, in a temporal fashion

miRNAs	Pancreatic organogenesis	Transcription factors
miR-124a, miR-23b	Primary transition	Hnf3b, Hlx9, Pdx1, Hes1, Isl1
miR-15a, miR-15b, miR-195, miR-16, miR-503, miR-541, miR-214	Secondary transition	Hnf6, Ngn3, NeuroD
–	Tertiary transition	–
miR-9, miR-375	Maturation and maintenance	Ptf1a, insulin release

the Hes1 target gene Ngn3. However, when Dicer was disrupted specifically in differentiated  $\beta$ -cells using the RIP-Cre mouse line, only small effects on pancreatic islet cell morphology and no apparent changes in  $\beta$ -cell mass and function were found (Kalis et al. 2011). Another miRNA involved in islet cell development is miRNA124 $\alpha$ . It has been shown that miRNA124 $\alpha$  regulates Foxa2 gene expression and that of its targets Pdx1, Kir6.2, and Sur1 (Baroukh et al. 2007). The last three genes also have important roles in glucose metabolism and insulin secretion. miRNA23b has been proposed to be involved in Hes1 regulation (Kimura et al. 2004) which tightly controls the number of Ngn3-producing cells. miR-15a, miR-15b, miR-16, and miR-195 also have important roles in regulating translation of Ngn3 in adult mice. These miRNAs are expressed at least 200-fold higher in the regenerating mouse pancreas as compared to E10.5 or E16.5 developing mouse pancreas. Moreover, overexpression of the mentioned miRNAs shows reduction in the number of hormone-producing cells (Joglekar et al. 2007).

An important miRNA for islet development is miR-375. Morpholino blockage of miRNA375 causes defects in the morphology of the pancreatic islet, in zebra fish. In this animal model, miR-375 is essential for formation of pancreatic islet and its knockdown results in dispersed pancreatic islets in later stages of embryonic development. Of note miRNA375 is conserved between zebra fish and mammals (Kloosterman et al. 2007). In addition, during pancreas organogenesis, miR-375 exhibits increased expression occurring together with augmented insulin transcript expression and  $\beta$ -cell proliferation (Joglekar et al. 2009). Moreover, it has been found that pancreatic islet-specific expression of miR-375 is regulated, in part, at the transcriptional level, because a region in the promoter of miR-375 contains consensus-binding sequences for Hnf6 and Insm1 (Avnit-Sagi et al. 2009). Finally, chromatin immunoprecipitation experiments have shown that NeuroD1 interacts with conserved sequences both upstream and downstream of the miR-375 gene and Pdx1 also interacted with the upstream region of the miR-375 gene (Keller et al. 2007). All these findings indicate that miR-375 gene is a target for key pancreatic transcription factors. Finally, miRNAs have also been involved in human pancreatic islet development (Van de Bunt et al. 2013). In this regard, four different islet-specific miRNAs (miR-7, miR-9, miR-375, and miR-376) have been found expressed at high levels during human pancreatic islet development (Correa-Medina et al. 2009; Joglekar et al. 2009).

The knowledge gain on the functional role of miRNA375 in pancreatic islet development has resulted in the design of a protocol capable to generate islet cells from human embryonic stem cells (hESCs) into islet cells by overexpressing miR-375, in the absence of any extrinsic factors. The authors transduced hESCs with lentiviral vectors containing human miR-375 precursor and aggregated to form human embryoid bodies for up to 21 days. The differentiated cells obtained expressed Foxa2, HNF4 $\alpha$ , Pdx1, Pax6, Nkx6.1, Glut2, and insulin. Insulin-positive cells were observed by immunohistochemistry. Moreover, they were able to detect insulin release upon glucose stimulation (Lahmy et al. 2013). Liao et al. (2013) have found that when hESCs are differentiated to insulin-producing cells, using a specific differentiation protocol, cells possessed distinct miRNA signatures during early and late stages of the differentiation process. They validate the functional roles for miR-200a in regulating definitive endoderm specification during early stages of differentiation. Moreover, they verified that miR-30d and let-7e regulate the expression of Rfx6. Finally, they identify critical miRNA–mRNA interactions occurring during the differentiation process. Another study followed the dynamic expression of miRNAs during the differentiation of hESCs into insulin-producing cells. This expression was compared with that in the development of human pancreatic islets. It was found that the dynamic expression patterns of miR-375 and miR-7 were similar to those seen in the development of human fetal pancreas, whereas the dynamic expression of miR-146a and miR-34a showed specific patterns during the differentiation. Furthermore, the expression of Hnf1 $\beta$  and Pax6, the predicted target genes of miR-375 and miR-7, was reciprocal to that of miR-375 and miR-7 (Wei et al. 2013).

Thus, there exist abundant data indicating that miRNAs are important in regulating ductal, exocrine, and endocrine development. Furthermore, some authors suggest that miRNA could mediate silencing of Ngn3 thereby favoring  $\beta$ -cell regeneration (Joglekar et al. 2007). The identification of miRNA targets and understanding the miRNA–mRNA interactions are key for elucidating the mechanisms of miRNA function in pancreas development.

The cascade of transcription factors that directs the differentiation of the foregut endoderm into the mature pancreatic islets has slowly emerged in the last decade. More recent studies have established a role of epigenetic mechanisms in cell fate decisions during endocrine pancreas development. Epigenetic events refer to modification of DNA which cause changes to the function and/or regulation of DNA. Epigenetic marks control the expression of genes that function in embryonic development, and other epigenetic programming events can happen. Recently, it has been shown that epigenetic processes contribute to the control of the transcriptional hierarchy that regulates gene expression during development, involving both histone modifications and DNA methylation and leading to facilitate or prevent recruitment of effector protein complexes (Avrahami and Kaestner 2012).

Genome-wide epigenetic studies of human pancreatic islets, using chromatin immunoprecipitation followed by high-throughput sequencing (ChIP-Seq analysis),

has found the presence of some bivalent marks in developmental regulatory genes of adult human islets (Barski et al. 2007; Heintzman et al. 2009). Transcription regulation involves an “open chromatin” structure. One way to study the involvement of chromatin structure in gene regulation is to define these open and closes regions and identify active DNA regulatory regions using Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements (FAIRE) technology. With this technology coupled to high-throughput sequencing, two research groups have identified sites of open chromatin, in human pancreatic islets, at islet-specific genes involved in islet cell development, such as *Pdx1*, *NeuroD*, *Nkx6.1*, *Arx*, and *Isl1* (Gunton et al. 2005; Gaulton et al. 2010). In this regard, a recent study (Papizan et al. 2011) has shown that in  $\beta$ -cells, *Nkx2.2* is part of a repression complex, together with DNMT3a, a de novo DNA methyltransferase important for establishing methylation patterns during development, the groucho-related repressor Grg3, and the histone deacetylase HDAC1. Analysis of the methylation profiles of endocrine cell fate determination genes identified CpG-rich areas in the regulatory region of *Arx*. Bisulfite-sequencing analysis of FACS-purified  $\alpha$ - and  $\beta$ -cells revealed that one of the CpG-rich areas in the *Arx* promoter is hypermethylated in  $\beta$ -cells, but hypomethylated in  $\alpha$ -cells (Collombat et al. 2005, 2007). Finally, using  $\beta$ -cell-specific ablation of the DNMT1 gene, a DNA methyltransferase that restores CpG methylation pattern after DNA replication in S-phase of the cell cycle suggests a possible role for DNA methylation in regulating  $\beta$ -cell identity (Dhawan et al. 2011). Thus, it is likely that epigenomic phenomena are involved in fine-tuning development and function of pancreatic cell types.

---

## Concluding Remarks

To date, the generation of fully functional islet cells from embryonic and adult stem cells or progenitor cells has yet to be achieved. This suggests that our knowledge of the transcription factors, microRNAs, and epigenetic marks coordinating in islet cell development is far from complete. Further dissection of the transcriptional network orchestrating pancreatic islet development and how miRNAs and epigenetic alterations influence this network is the next challenge in order to develop more robust in vitro differentiation protocols.

**Acknowledgments** We thank members of the Stem Cell and Cell Therapy and Regenerative Medicine Departments from CABIMER for stimulating discussions on diabetes cell therapy and pancreas development. A. R. is supported by a grant from ISCIII co-funded by Fondos FEDER (PI11/01125). M. C. is supported by a predoctoral fellowship from Spanish Ministry of Education. I. D. is supported by a contract from Consejería de Salud (Junta de Andalucía, PI00-0008 to A. R.). B. R. G. is supported by grants from the Consejería de Salud, Fundacion Publica Andaluza Progreso y Salud, Junta de Andalucía (PI-0727-2010), Instituto de Salud Carlos III co-funded by Fondos FEDER (PI10/00871) and by the Juvenile Diabetes Research Foundation (17-2013-372). FM is supported by grants from Junta de Andalucía (BIO-311). We apologize to colleagues whose work could not be cited because of space constraints.

## Cross-References

- ▶ (Dys)Regulation of Insulin Secretion by Macronutrients
- ▶ Electrical, Calcium, and Metabolic Oscillations in Pancreatic Islets
- ▶ Human Islet Autotransplantation
- ▶ Immunology of  $\beta$ -Cell Destruction
- ▶ Pancreatic  $\beta$  Cells in Metabolic Syndrome
- ▶ Stem Cells in Pancreatic Islets
- ▶ The comparative Anatomy of Islets
- ▶ Wnt Signaling in Pancreatic Islets

## References

- Ahlgren U, Jonsson J, Edlund H (1996) The morphogenesis of the pancreatic mesenchyme is uncoupled from that of the pancreatic epithelium in IPF1/PDX1-deficient mice. *Development* 122:1409–1416
- Ahlgren U, Jonsson J, Jonsson L, Simu K, Edlund H (1998)  $\beta$ -cell-specific inactivation of the mouse *Ipfl/Pdx1* gene results in loss of the  $\beta$ -cell phenotype and maturity onset diabetes. *Genes Dev* 12:1763–1768
- Ambros V (2004) The function of animals micro RNAs. *Nature* 431:350–355
- Aramata S, Hang SI, Kataoka K (2007) Roles and regulation of transcription factor MafA in islet  $\beta$ -cell. *Endocr J* 54:659–666
- Arda HE, Benitez CM, Kim SK (2013) Gene regulatory networks governing pancreas development. *Dev Cell* 25(1):5–13
- Artner I, Le Lay J, Hang Y, Elghazi L, Schisler JC, Henderson E, Sosa-Pineda B, Stein R (2006) MafB: an activator of the glucagon gene expressed in developing islet  $\alpha$ - and  $\beta$ -cells. *Diabetes* 55:297–304
- Artner I, Blanchi B, Raum JC, Guo M, Kaneko T, Cordes S, Sieweke M, Stein R (2007) MafB is required for islet  $\beta$  cell maturation. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:3853–3858
- Artner I, Hang Y, Mazur M, Yamamoto T, Guo M, Lindner J, Magnuson MA, Stein R (2010) MafA and MafB regulate genes critical to  $\beta$ -cells in a unique temporal manner. *Diabetes* 59:2530–2539
- Assan R, Biollot J (1973) Pancreatic glucagon and glucagon-like material in tissues and plasma from human fetuses 6–26 weeks old. *Pathol Biol (Paris)* 21:149–155
- Avnit-Sagi T, Kantorovich L, Kredo-Russo S, Hornstein E, Walker MD (2009) The promoter of the *pri-miR-375* gene directs expression selectively to the endocrine pancreas. *PLoS One* 4:e5033
- Avrahami D, Kaestner KH (2012) Epigenetic regulation of pancreas development and function. *Semin Cell Dev Biol* 23:693–700
- Baroukh N, Ravier MA, Loder MK, Hill EV, Bounacer A, Scharfmann R, Rutter GA, Van Obberghen E (2007) MicroRNA-124a regulates *Foxa2* expression and intracellular signaling in pancreatic  $\beta$ -cell lines. *J Biol Chem* 282:19575–19588
- Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Schones DE, Wang Z, Wei G, Chepelev I, Zhao K (2007) High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* 129:823–837
- Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116:281–297
- Beringue F, Blondeau B, Castellotti MC, Breant B, Czernichow P, Polak M (2002) Endocrine pancreas development in growth-retarded human fetuses. *Diabetes* 51:385–391
- Bernstein E, Kim SY, Carmell MA, Murchison EP, Alcorn H, Li MZ, Mills AA, Elledge SJ, Anderson KV, Hannon GJ (2003) Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet* 35:215–217

- Bonner-Weir S, Taneja M, Weir GC, Tatarkiewicz K, Song KH, Sharma A, O'Neil JJ (2000) In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:7999–8004
- Bonner-Weir S, Li WC, Ouziel-Yahalom L, Guo L, Weir GC, Sharma A (2010)  $\beta$ -cell growth and regeneration: replication is only part of the story. *Diabetes* 59:2340–2348
- Burlison JS, Long Q, Fujitani Y, Wright CV, Magnuson MA (2008) Pdx-1 and Ptf1a concurrently determine fate specification of pancreatic multipotent progenitor cells. *Dev Biol* 316(1):74–86
- Cabrera O, Berman M, Kenyon NS, Ricordi C, Berggren P, Caicedo A (2006) The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:2334–2339
- Carrasco M, Delgado I, Soria B, Martín F, Rojas A (2012) GATA4 and GATA6 control mouse pancreas organogenesis. *J Clin Invest* 122:3504–3515
- Chiang MK, Melton DA (2003) Single-cell transcript analysis of pancreas development. *Dev Cell* 4(3):383–393
- Collombat P, Mansouri A, Hecksher-Sorensen J, Serup P, Krull J, Gradwohl G, Gruss P (2003) Opposing actions of Arx and Pax4 in endocrine pancreas development. *Genes Dev* 17:2591–2603
- Collombat P, Hecksher-Sørensen J, Broccoli V, Krull J, Ponte I, Mundiger T, Smith J, Gruss P, Serup P, Mansouri A (2005) The simultaneous loss of Arx and Pax4 genes promotes a somatostatin-producing cell fate specification at the expense of the  $\alpha$ - and  $\beta$ -cell lineages in the mouse endocrine pancreas. *Development* 132:2969–2980
- Collombat P, Hecksher-Sorensen J, Krull J, Berger J, Riedel D, Herrera PL, Serup P, Mansouri A (2007) Embryonic endocrine pancreas and mature  $\beta$  cells acquire  $\alpha$  and PP cell phenotypes upon Arx misexpression. *J Clin Invest* 117(4):961–970
- Collombat P, Xu X, Ravassard P, Sosa-Pineda B, Dussaud S, Billestrup N, Madsen OD, Serup P, Heimberg H, Mansouri A (2009) The ectopic expression of Pax4 in the mouse pancreas converts progenitor cells into  $\alpha$  and subsequently  $\beta$  cells. *Cell* 138:449–462
- Correa-Medina M, Bravo-Egana V, Rosero S, Ricordi C, Edlund H, Diez J, Pastori RL (2009) MicroRNA miR-7 is preferentially expressed in endocrine cells of the developing and adult human pancreas. *Gene Expr Patterns* 9:193–199
- Dave SD, Vanikar AV, Trivedi HL (2013) In-vitro generation of human adipose tissue derived insulin secreting cells: up-regulation of Pax-6, Ipfl-1 and Isl-1. *Cytotechnology* 65:299–307
- Desgraz R, Herrera PL (2009) Pancreatic neurogenin 3-expressing cells are unipotent islet precursors. *Development* 136:3567–3574
- Dhawan S, Georgia S, Tschen SI, Fan G, Bhushan A (2011) Pancreatic  $\beta$  cell identity is maintained by DNA methylation-mediated repression of Arx. *Dev Cell* 20:419–429
- Du A, Hunter CS, Murray J, Noble D, Cai CL, Evans SM, Stein R, May CL (2009) Islet-1 is required for the maturation, proliferation, and survival of the endocrine pancreas. *Diabetes* 58:2059–2069
- Dumortier O, Blondeau B, Du villie B, Reusens B, Breant B, Remacle C (2007) Different mechanisms operating during different critical time-windows reduce rat fetal  $\beta$ -cell mass due to a maternal low-protein or low energy diet. *Diabetologia* 50:2495–2503
- Ejarque M, Cervantes S, Pujadas G, Tutusaus A, Sanchez L, Gasa R (2013) Neurogenin3 cooperates with Foxa2 to autoactivate its own expression. *J Biol Chem* 26:11705–11717
- Gannon M, Ables ET, Crawford L, Lowe D, Offield MF, Magnuson MA, Wright CV (2008) pdx-1 function is specifically required in embryonic  $\beta$  cells to generate appropriate numbers of endocrine cell types and maintain glucose homeostasis. *Dev Biol* 314(2):406–417
- Gasa R, Mrejen C, Leachman N, Otten M, Barnes M, Wang J, Chakrabarti S, Mirmira R, German M (2004) Proendocrine genes coordinate the pancreatic islet differentiation program in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(36):13245–13250



- Gaulton KJ, Nammo T, Pasquali L, Simon JM, Giresi PG, Fogarty MP, Panhuis TM, Mieczkowski P, Secchi A, Bosco D, Berney T, Montanya E, Mohlke KL, Lieb JD, Ferrer J (2010) A map of open chromatin in human pancreatic islets. *Nat Genet* 42:255–259
- Gradwohl G, Dierich A, LeMeur M, Guillemot F (2000) Neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:1607–1611
- Gu C, Stein GH, Pan N, Goebbels S, Hörnberg H, Nave KA, Herrera P, White P, Kaestner KH, Sussel L, Lee JE (2010) Pancreatic  $\beta$  cells require NeuroD to achieve and maintain functional maturity. *Cell Metab* 11:298–310
- Guillemain G, Filhoulard G, Da Silva-Xavier G, Rutter GA, Scharfmann R (2007) Glucose is necessary for embryonic pancreatic endocrine cell differentiation. *J Biol Chem* 282:15228–15237
- Gunton JE, Kulkarni RN, Yim S, Okada T, Hawthorne WJ, Tseng YH, Roberson RS, Ricordi C, O'Connell PJ, Gonzalez FJ, Kahn CR (2005) Loss of ARNT/HIF1 $\beta$  mediates altered gene expression and pancreatic-islet dysfunction in human type 2 diabetes. *Cell* 122:337–349
- Hald J, Sprinkel AE, Ray M, Serup P, Wright C, Madsen OD (2008) Generation and characterization of Ptf1a antiserum and localization of Ptf1a in relation to Nkx6.1 and Pdx1 during the earliest stages of mouse pancreas development. *J Histochem Cytochem* 56(6):587–595
- Heinis M, Simon MT, Ilc K, Mazure NM, Pouyssegur J, Scharfmann R, Duvalle B (2010) Oxygen tension regulates pancreatic  $\beta$ -cell differentiation through hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *Diabetes* 59:662–669
- Heintzman ND, Hon GC, Hawkins RD, Kheradpour P, Stark A, Harp LF, Ye Z, Lee LK, Stuart RK, Ching CW, Ching KA, Antosiewicz-Bourget JE, Liu H, Zhang X, Green RD, Lobanov VV, Stewart R, Thomson JA, Crawford GE, Kellis M, Ren B (2009) Histone modifications at human enhancers reflect global cell-type-specific gene expression. *Nature* 459:108–112
- Henseleit KD, Nelson SB, Kuhlbrodt K, Hennings JC, Ericson J, Sander M (2005) NKX6 transcription factor activity is required for  $\alpha$ - and  $\beta$ -cell development in the pancreas. *Development* 132:3139–3149
- Herrera PL, Huarte J, Sanvito F, Meda P, Orci L, Vasalli JD (1991) Embryogenesis of the murine endocrine pancreas; early expression of pancreatic polypeptide gene. *Development* 113:1257–1265
- Holland AM, Góñez LJ, Naselli G, Macdonald RJ, Harrison LC (2005) Conditional expression demonstrates the role of the homeodomain transcription factor Pdx1 in maintenance and regeneration of  $\beta$ -cells in the adult pancreas. *Diabetes* 54:2586–2595
- Huang HP, Liu M, El-Hodiri HM, Chu K, Jamrich M, Tsai MJ (2000) Regulation of the pancreatic islet-specific gene  $\beta$ 2 (neuroD) by neurogenin 3. *Mol Cell Biol* 20:3292–3307
- Ianus A, Holz GG, Theise ND, Hussain MA (2003) In vivo derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. *J Clin Invest* 111:843–850
- Jeon J, Correa-Medina M, Ricordi C, Edlund H, Diez JA (2009) Endocrine cell clustering during human pancreas development. *J Histochem Cytochem* 57:383–393
- Joglekar MV, Parek VS, Hardikar AA (2007) New pancreas from old: microregulators of pancreas regeneration. *Trends Endocrinol Metab* 18:393–400
- Joglekar MV, Joglekar VM, Hardikar AA (2009) Expression of islet-specific microRNAs during human pancreatic development. *Gene Expr Patterns* 9:109–113
- Johansson KA, Dursun U, Jordan N, Gu G, Beermann F, Gradwohl G, Grapin-Botton A (2007) Temporal control of neurogenin3 activity in pancreas progenitors reveals competence windows for the generation of different endocrine cell types. *Dev Cell* 12:457–465
- Jonsson J, Carlsson L, Edlund T, Edlund H (1994) Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development. *Nature* 371:606–609
- Kalis M, Bolmeson C, Esguerra JL, Gupta S, Edlund A, Tormo-Badia N, Speidel D, Holmberg D, Mayans S, Khoo NK, Wendt A, Eliasson L, Cilio CM (2011)  $\beta$  cell specific deletion of Dicer1 leads to defective insulin secretion and diabetes mellitus. *PLoS One* 6:e29166

- Kawaguchi Y, Cooper B, Gannon M, Ray M, MacDonald RJ, Wright CV (2002) The role of the transcriptional regulator Ptf1a in converting intestinal to pancreatic progenitors. *Nat Genet* 32(1):128–134
- Keller DM, McWeeney S, Arsenlis A, Drouin J, Wright CV, Wang H, Wollheim CB, White P, Kaestner KH, Goodman RH (2007) Characterization of pancreatic transcription factor Pdx-1 binding sites using promoter microarray and serial analysis of chromatin occupancy. *J Biol Chem* 282:32084–32092
- Kimura H, Kawasaki H, Taira K (2004) Mouse microRNA-23b regulates expression of Hes1 in P19 cells. *Nucleic Acids Symp Ser* 48:213–214
- Kloosterman WP, Lagendijk AK, Ketting RF, Moulton JD, Plasterk RH (2007) Targeted inhibition of miRNA maturation with morpholinos reveals a role for miR-375 in pancreatic islet development. *PLoS Biol* 5:e203
- Kopinke D, Murtaugh LC (2010) Exocrine-to-endocrine differentiation is detectable only prior to birth in the uninjured mouse pancreas. *BMC Dev Biol* 10:38
- Kopinke D, Brailsford M, Shea JE, Leavitt R, Scaife CL, Murtaugh LC (2011) Lineage tracing reveals the dynamic contribution of Hes1<sup>+</sup> cells to the developing and adult pancreas. *Development* 138(3):431–441
- Kopp JL, Dubois CL, Schaffer AE, Hao E, Shih HP, Seymour PA, Ma J, Sander M (2011) Sox9<sup>+</sup> ductal cells are multipotent progenitors throughout development but do not produce new endocrine cells in the normal or injured adult pancreas. *Development* 138(4):653–665
- Kroon E, Martinson LA, Kadoya K, Bang AG, Kelly OG, Eliazar S, Young H, Richardson M, Smart NG, Cunningham J, Agulnick AD, D'Amour KA, Carpenter MK, Baetge EE (2008) Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo. *Nat Biotechnol* 26:443–452
- Lahmy R, Soleimani M, Sanati MH, Behmanesh M, Kouhkan F, Mobarra N (2013) Pancreatic islet differentiation of human embryonic stem cells by microRNA overexpression. *J Tissue Eng Regen Med*. doi: 10.1002/term.1787
- Lee JC, Smith SB, Watada H, Lin J, Scheel D, Wang J, Mirmira RG, German MS (2001) Regulation of the pancreatic pro-endocrine gene neurogenin3. *Diabetes* 50(5):928–936
- Liao X, Xue H, Wang YC, Nazor KL, Guo S, Trivedi N, Peterson SE, Liu Y, Loring JF, Laurent LC (2013) Matched miRNA and mRNA signatures from an hESC-based in vitro model of pancreatic differentiation reveal novel regulatory interactions. *J Cell Sci* 126:3848–3861
- Like AA, Orci L (1972) Embryogenesis of the human pancreatic islets: a light and electron microscopic study. *Diabetes* 21:511–534
- Lottmann H, Vanselow J, Hessabi B, Walther R (2001) The Tet-On system in transgenic mice: inhibition of the mouse pdx-1 gene activity by antisense RNA expression in pancreatic  $\beta$ -cells. *J Mol Med (Berl)* 79:321–328
- Lynn FC, Skewes-Cox P, Kosaka Y, Mcmanus MT, Harfe BD, German MS (2007a) Micro RNA expression is required for pancreatic islet cell genesis in the mouse. *Diabetes* 56:2938–2945
- Lynn FC, Smith SB, Wilson ME, Yang KY, Nekrep N, German MS (2007b) Sox9 coordinates a transcriptional network in pancreatic progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(25):10500–10505. 0704054104 [pii]
- Mastracci TL, Anderson KR, Papizan JB, Sussel L (2013) Regulation of Neurod1 contributes to the lineage potential of Neurogenin3<sup>+</sup> endocrine precursor cells in the pancreas. *PLoS Genet* 9(2):e1003278
- Matsuoka TA, Artner I, Henderson E, Means A, Sander M, Stein R (2004) The MafA transcription factor appears to be responsible for tissue-specific expression of insulin. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:2930–2933
- Mellitzer G, Bonn   S, Lucio RF, Van De Casteele M, Lenne-Samuel N, Collombat P, Mansouri A, Lee J, Lan M, Pipeleers D, Nielsen FC, Ferrer J, Gradwohl G, Heimberg H (2006) IA1 is NGN3-dependent and essential for differentiation of the endocrine pancreas. *EMBO J* 25:1344–1352

- Morita S, Horii T, Kimura M, Goto Y, Ochiya T, Hatada I (2007) One Argonaute family member, Eif2c2 (Ago2), is essential for development and appears not to be involved in DNA methylation. *Genomics* 89:687–696
- Nicolini U, Hubinont C, Santolaya J, Fisk NM, Rodeck CH (1990) Effects of fetal intravenous glucose challenge in normal and growth retarded fetuses. *Horm Metab Res* 22:426–430
- Nishimura W, Kondo T, Salameh T, El Khattabi I, Dodge R, Bonner-Weir S, Sharma A (2006) A switch from MafB to MafA expression accompanies differentiation to pancreatic  $\beta$ -cells. *Dev Biol* 293:526–539
- Nishimura W, Rowan S, Salameh T, Mass RL, Bonner-Weir S, Sell SM, Sharma A (2008) Preferential reduction of  $\beta$  cells derived from Pax6-MafB pathway MafB deficient mice. *Dev Biol* 314:443–456
- Offield MF, Jetton TL, Labosky PA, Ray M, Stein RW, Magnuson MA, Hogan BL, Wright CV (1996) Pdx1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development* 122:983–995
- Oliver-Krasinski JM, Kasner MT, Yang J, Crutchlow MF, Rustgi AK, Kaestner KH, Stoffers DA (2009) The diabetes gene Pdx1 regulates the transcriptional network of pancreatic endocrine progenitor cells in mice. *J Clin Invest* 119(7):1888–1898. 37028 [pii]
- Papizan JB, Singer RA, Tschen SI, Dhawan S, Friel JM, Hipkens SB, Magnuson MA, Bhushan A, Sussel L (2011) Nkx2.2 repressor complex regulates islet  $\beta$ -cell specification and prevents  $\beta$ -to- $\alpha$ -cell reprogramming. *Genes Dev* 25:2291–2305
- Pictet R, Rutter WJ (1972) Development of the embryonic endocrine pancreas. In: Greep RO, Astwood EB, Steiner DF, Freinkel N, Geiger SR (eds) *Handbook of physiology*, vol I. American Physiological Society, Washington, DC, pp 25–76
- Pictet RL, Clark WR, Williams RH, Rutter WJ (1972) An ultrastructural analysis of the developing embryonic pancreas. *Dev Biol* 29:436–467
- Piper K, Ball SG, Turnpenny LW, Brickwood S, Wilson DI, Hanley NA (2002)  $\beta$ -cell differentiation during human development does not rely on nestin-positive precursors: implications for stem cell-derived replacement therapy. *Diabetologia* 45:1045–1047
- Polak M, Bouchareb-Banaei L, Scharfmann R, Czernichow P (2000) Early pattern of differentiation in the human pancreas. *Diabetes* 49:225–232
- Prado CL, Pugh-Bernard AE, Elghazi L, Sosa-Pineda B, Sussel L (2004) Ghrelin cells replace insulin-producing  $\beta$  cells in two mouse models of pancreas development. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:2924–2929
- Puri S, Hebrok M (2010) Cellular plasticity within the pancreas: lessons learned from development. *Dev Cell* 18:342–356
- Raum JC, Gerrish K, Artner I, Henderson E, Guo M, Sussel L, Schisler JC, Newgard CB, Stein R (2006) FoxA2, Nkx2.2, and PDX-1 regulate islet  $\beta$ -cell-specific MafA expression through conserved sequences located between base pairs -8118 and -7750 upstream from the transcription start site. *Mol Cell Biol* 26:5735–5743
- Runhke M, Ungefroren H, Nussler A, Martin F, Brulport M, Schormann W, Hengstler JG, Klapper W, Ulrichs K, Hutchinson JA, Soria B, Parwaresch RM, Heeckt P, Kremer B, Fändrich F (2005) Differentiation of in vitro-modified human peripheral blood monocytes into hepatocyte-like and pancreatic islet-like cells. *Gastroenterology* 128:1774–1786
- Sander M, Sussel L, Connors J, Scheel D, Kalamaras J, Dela Cruz F, Schwitzgebel V, Hayes-Jordan A, German M (2000) Homeobox gene Nkx6.1 lies downstream of Nkx2.2 in the major pathway of  $\beta$ -cell formation in the pancreas. *Development* 127:5533–5540
- Sarkar SA, Kobberup S, Wong R, Lopez AD, Quayum N, Still T, Kutchma A, Jensen JN, Gianani R, Beattie GM, Jensen J, Hayek A, Hutton JC (2008) Global gene expression profiling and histochemical analysis of the developing human fetal pancreas. *Diabetologia* 51:285–297
- Schaffer AE, Freude KK, Nelson SB, Sander M (2010) Nkx6 transcription factors and Ptf1a function as antagonistic lineage determinants in multipotent pancreatic progenitors. *Dev Cell* 18(6):1022–1029

- Schaffer AE, Taylor BL, Benthuyzen JR, Liu J, Thorel F, Yuan W, Jiao Y, Kaestner KH, Herrera PL, Magnuson MA, May CL, Sander M (2013) Nkx6.1 controls a gene regulatory network required for establishing and maintaining pancreatic  $\beta$  cell identity. *PLoS Genet* 9(1):e1003274
- Schwitzgebel VM, Scheel DW, Connors JR, Kalamaras J, Lee JE, Anderson DJ, Sussel L, Johnson JD, German MS (2000) Expression of neurogenin3 reveals an islet cell precursor population in the pancreas. *Development* 127(16):3533–3542
- Slack JM (1995) Developmental biology of the pancreas. *Science* 26:1203–1205
- Smith SB, Gasa R, Watada H, Wang J, Griffen SC, German MS (2003) Neurogenin3 and hepatic nuclear factor 1 cooperate in activating pancreatic expression of Pax4. *J Biol Chem* 278:38254–38259
- Smith SB, Qu HQ, Taleb N, Kishimoto NY, Scheel DW, Lu Y, Patch AM, Grabs R, Wang J, Lynn FC, Miyatsuka T, Mitchell J, Seerke R, Désir J, Vanden Eijnden S, Abramowicz M, Kacet N, Weill J, Renard ME, Gentile M, Hansen I, Dewar K, Hattersley AT, Wang R, Wilson ME, Johnson JD, Polychronakos C, German MS (2010) Rfx6 directs islet formation and insulin production in mice and human. *Nature* 463:775–780
- Solar M, Cardalda C, Houbracken I, Martin M, Maestro MA, De Medts N, Xu X, Grau V, Heimberg H, Bouwens L, Ferrer J (2009) Pancreatic exocrine duct cells give rise to insulin-producing  $\beta$  cells during embryogenesis but not after birth. *Dev Cell* 17:849–860
- Soria B, Roche E, Berná G, León-Quinto T, Reig JA, Martin F (2000) Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes* 49:157–162
- Soria B, Bedoya FJ, Tejedo JR, Hmadcha A, Ruiz-Salmerón R, Lim S, Martin F (2008) Cell therapy for diabetes mellitus: an opportunity for stem cells? *Cells Tissues Organs* 188:70–77
- Soria B, Tudurí E, González A, Hmadcha A, Martin F, Nadal A, Quesada I (2010) Pancreatic islet cells: a model for calcium-dependent peptide release. *HSFP J* 4:52–60
- Sosa-Pineda B, Chowdhury K, Torres M, Oliver G, Gruss P (1997) The Pax4 gene is essential for differentiation of insulin-producing  $\beta$  cells in the mammalian pancreas. *Nature* 386:399–402
- Soyer J, Flasse L, Raffelsberger W, Beucher A, Orvain C, Peers B, Ravassard P, Vermot J, Voz ML, Mellitzer G, Gradwohl G (2010) Rfx6 is an Ngn3-dependent winged helix transcription factor required for pancreatic islet cell development. *Development* 137:203–212
- Stefan Y, Grasso S, Perrelet A, Orci L (1983) A quantitative immunofluorescence study of the endocrine cell populations in the developing human pancreas. *Diabetes* 32:293–301
- Steiner DJ, Kim A, Miller K, Hara M (2010) Pancreatic islet plasticity: interspecies comparison of islet architecture and composition. *Islets* 2:135–145
- Sugiyama T, Rodriguez RT, McLean GW, Kim SK (2007) Conserved markers of fetal pancreatic epithelium permit prospective isolation of islet progenitor cells by FACS. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:175–180
- Sussel L, Kalamaras J, Hartigan-O'Connor DJ, Meneses JJ, Pedersen RA, Rubenstein JL, German MS (1998) Mice lacking the homeodomain transcription factor Nkx2.2 have diabetes due to arrested differentiation of pancreatic  $\beta$  cells. *Development* 125:2213–2221
- Tang F, Kaneda M, O'Carroll D, Hajkova P, Barton SC, Sun YA, Lee C, Tarakhovsky A, Lao K, Surani MA (2007) Maternal microRNAs are essential for mouse zygote development. *Genes Dev* 21:644–648
- Thomas MK, Devon ON, Lee JH, Peter A, Schlosser DA, Tenser MS, Habener JF (2001) Development of diabetes mellitus in aging transgenic mice following suppression of pancreatic homeoprotein IDX-1. *J Clin Invest* 108:319–329
- Thorel F, Népoté V, Avril I, Kohno K, Desgraz R, Chera S, Herrera PL (2010) Conversion of adult pancreatic  $\alpha$ -cells to  $\beta$ -cells after extreme  $\beta$ -cell loss. *Nature* 464:1149–1154
- Van de Bunt M, Gaulton KJ, Parts L, Moran I, Johnson PR, Lindgren CM, Ferrer J, Gloyn AL, McCarthy MI (2013) The miRNA profile of human pancreatic islets and  $\beta$ -cells and relationship to type 2 diabetes pathogenesis. *PLoS One* 8(1):e55272

- Villaseñor A, Chong DC, Cleaver O (2008) Biphasic Ngn3 expression in the developing pancreas. *Dev Dyn* 237:3270–3279
- Villaseñor A, Chong DC, Henkemeyer M, Cleaver O (2010) Epithelial dynamics of pancreatic branching morphogenesis. *Development* 137:4295–4305
- Wang H, Brun T, Kataoka K, Sharma AJ, Wollheim CB (2007) MafA controls genes implicated in biosynthesis and secretion. *Diabetologia* 50:348–358
- Wang S, Hecksher-Sorensen J, Xu Y, Zhao A, Dor Y, Rosenberg L, Serup P, Gu G (2008) Myt1 and Ngn3 form a feed-forward expression loop to promote endocrine islet cell differentiation. *Dev Biol* 317:531–540
- Watada H, Scheel DW, Leung J, German MS (2003) Distinct gene expression programs function in progenitor and mature islet cells. *J Biol Chem* 278:17130–17140
- Wei R, Yang J, Liu GQ, Gao MJ, Hou WF, Zhang L, Gao HW, Liu Y, Chen GA, Hong TP (2013) Dynamic expression of microRNAs during the differentiation of human embryonic stem cells into insulin-producing cells. *Gene* 518:246–255
- Xu X, D'Hoker J, Stangé G, Bonnè S, De Leu N, Xiao X, Van de Casteele M, Mellitzer G, Ling Z, Pipeleers D, Bouwens L, Scharfmann R, Gradwohl G, Heimberg H (2008)  $\beta$  cells can be generated from endogenous progenitors in injured adult mouse pancreas. *Cell* 132:197–207
- Xuan S, Borok MJ, Decker KJ, Battle MA, Duncan SA, Hale MA, Macdonald RJ, Sussel L (2012) Pancreas-specific deletion of mouse Gata4 and Gata6 causes pancreatic agenesis. *J Clin Invest* 122:3516–3528
- Yang YP, Thorel F, Boyer DF, Herrera PL, Wright CV (2011) Context-specific  $\alpha$ - to- $\beta$ -cell reprogramming by forced Pdx1 expression. *Genes Dev* 25(16):1680–1685
- Zhang C, Moriguchi T, Kajihara M, Esaki R, Harada A, Shimohata H, Oishi H, Hamada M, Morito N, Hasegawa K, Kudo T, Engel JD, Yamamoto M, Takahashi S (2005) MafA is a key regulator of glucose-stimulated insulin secretion. *Mol Cell Biol* 25:4969–4976
- Zhang D, Jiang W, Liu M, Sui X, Yin X, Chen S, Shi Y, Deng H (2009) Highly efficient differentiation of human ES cells and iPS cells into mature pancreatic insulin-producing cells. *Cell Res* 19:429–438
- Zhou Q, Law AC, Rajagopal J, Anderson WJ, Gray PA, Melton DA (2007) A multipotent progenitor domain guides pancreatic organogenesis. *Dev Cell* 13:103–114